

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Lekarski I

Joanna Talarczyk-Desole

**Ocena związku wybranych polimorfizmów
genów receptora estrogenowego 1 i 2
oraz wykładników apoptozy plemników
z parametrami określającymi
zdolność zapładniającą gamet męskich**

Rozprawa doktorska

Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu
Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej

Promotor: Prof. dr hab.med. Piotr Jędrzejczak

Poznań 2014

*Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi – Panu Profesorowi Piotrowi Jędrzejczakowi
oraz Pani Profesor Małgorzacie Kotwickiej
i Panu Profesorowi Leszkowi Pawelczykowi
za wielką pomoc, życzliwość i wsparcie.*

Pracę dedykuję Mojej Rodzinie.

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów	8
1. WSTĘP	13
1.1. Wprowadzenie	13
1.2. Struktura plemnika i jego funkcja w procesie zapłodnienia	14
1.3. Mechanizmy śmierci plemników	16
1.3.1. Apoptoza w komórkach somatycznych	17
1.3.2. Apoptoza w plemnikach ludzkich	19
1.3.3. Apoptoza plemników a płodność męska	21
1.4. Zapłodnienie	22
1.4.1. Ocena funkcji zapładniającej plemnika	24
1.5. Estrogeny w organizmie ludzkim	25
1.5.1. Rola estrogenów w ustroju	25
1.5.2. Estrogeny w męskim układzie rozrodczym	26
1.5.3. Mechanizmy działania estrogenów	27
1.5.3.1. Receptory estrogenowe	27
1.5.3.2. Genomowy mechanizm działania estrogenów	29
1.5.3.3. Niegenomowy mechanizm działania estrogenów	30
1.5.4. Receptory estrogenowe w męskim układzie rozrodczym	32
1.6. Polimorfizmy genetyczne i ich związek z podatnością na choroby	34
1.7. Polimorfizmy genów receptora estrogenowego 1 i 2 a podatność na choroby	35
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	38
2.1. Założenia pracy	38
2.2. Cel pracy	39
3. MATERIAŁ	40
3.1. Charakterystyka grupy badanej	40
3.2. Badanie nasienia	41
3.3. Procedura zapłodnienia pozaustrojowego	41
3.4. Analiza polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2	42
4. METODY	43
4.1. Ocena podstawowych parametrów seminologicznych nasienia	43
4.1.1. Ocena żywotności plemników – test hipoosmotyczny	44
4.2. Procedura zapłodnienia pozaustrojowego	44
4.2.1. Stymulacja jajczkowania	44
4.2.2. Ocena komórek jajowych	45

4.2.3. Przygotowanie nasienia do procedury zapłodnienia pozaustrojowego	45
4.2.4. Zapłodnienie pozaustrojowe metodą klasyczną	46
4.2.5. Zapłodnienie pozaustrojowe metodą mikroiniekcijną	46
4.2.6. Ocena skuteczności zapłodnienia pozaustrojowego	46
4.3. Badanie wykładników apoptozy plemników	46
4.3.1. Oznaczanie błonowej translokacji fosfatydyloseryny	46
4.3.2. Wykrywanie plemników z aktywną formą kaspazy-3	47
4.3.3. Technika pomiarów w cytometrze przepływowym	48
4.4. Analiza genetyczna	48
4.4.1. Izolacja genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej	48
4.4.2. PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy	49
4.4.3. Elektroforetyczna analiza produktu PCR	51
4.4.4. Enzymy restrykcyjne wykorzystane do oceny SNP genów <i>ESR1</i> i <i>ESR2</i>	52
4.4.5. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych	52
4.5. Analiza statystyczna	54
5. WYNIKI	55
5.1. Charakterystyka badanych pacjentów	55
5.2. Analiza parametrów nasienia w grupie badanej	56
5.2.1. Podstawowe parametry nasienia	56
5.2.2. Wykładniki apoptozy w plemnikach	56
5.2.3. Ocena zależności podstawowych parametrów nasienia i wykładników apoptozy plemników	58
5.3. Ocena związku podstawowych parametrów nasienia i wyników zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody zapłodnienia pozaustrojowego	59
5.4. Występowanie polimorfizmów genu receptora estrogenowego 1.	61
5.4.1. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>PvuII</i> a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników	62
5.4.2. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>XbaI</i> a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników	64
5.4.3. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>PvuII</i> a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF	65
5.4.4. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>XbaI</i> a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF	66
5.4.5. Ocena zależności poszczególnych genotypów miejsc restrykcyjnych <i>PvuII</i> i <i>XbaI</i> i parametrów nasienia oraz skuteczności zapłodnienia metodą	66

konwencjonalnego IVF i ICSI	
5.5. Występowanie polimorfizmów genu receptora estrogenowego 2.	69
5.5.1. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>AluI</i> a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników	70
5.5.2. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>RsaI</i> a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników	71
5.5.3. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>AlwMI</i> a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników	73
5.5.4. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>AluI</i> a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF	74
5.5.5. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>RsaI</i> a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF	75
5.5.6. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego <i>AlwMI</i> a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF	75
5.5.7. Ocena zależności poszczególnych genotypów miejsc restrykcyjnych <i>AluI</i> , <i>RsaI</i> i <i>AlwMI</i> i parametrów nasienia oraz skuteczności zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF i ICSI	75
5.6. Wykładniki apoptozy plemników a skuteczność zapłodnienia pozaustrojowego	78
6. DYSKUSJA	81
6.1. Założenia i metodyka pracy	81
6.2. Polimorfizmy miejsc restrykcyjnych <i>PvuII</i> i <i>XbaI</i> genu <i>ESR1</i> oraz <i>AluI</i> , <i>RsaI</i> i <i>AlwMI</i> genu <i>ESR2</i> – omówienie wyników w zakresie parametrów nasienia	86
6.3. Polimorfizmy miejsc restrykcyjnych <i>PvuII</i> i <i>XbaI</i> genu <i>ESR1</i> oraz <i>AluI</i> , <i>RsaI</i> i <i>AlwMI</i> genu <i>ESR2</i> – omówienie wyników w zakresie skuteczności zapłodnienia	90
6.4. Polimorfizmy miejsc restrykcyjnych <i>PvuII</i> i <i>XbaI</i> genu <i>ESR1</i> oraz <i>AluI</i> , <i>RsaI</i> i <i>AlwMI</i> genu <i>ESR2</i> – omówienie wyników w zakresie związku polimorfizmów z wykładnikami apoptozy plemników	92
6.5. Apoptoza plemników a zdolność zapładniająca gamet męskich	93
7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	96
8. STRESZCZENIE	98
9. SUMMARY	102
PIŚMIENNICTWO	105

WYKAZ SKRÓTÓW

A	adenina
ADAM	dezintegryna i metaloproteinaza (ang. <i>a disintegrin and metalloproteinase</i>)
AF-1	motyw aktywujący transkrypcję-1 (ang. <i>activation function-1</i>)
AF-2	motyw aktywujący transkrypcję-2 (ang. <i>activation function-2</i>)
AnV	aneksyna-V
AnV-FITC	aneksyna-V znakowana fluoresceiną
Apaf-1	apoptotyczny czynnik aktywujący proteazę-1 (ang. <i>apoptotic protease activating factor-1</i>)
ArKO	mysz pozbawiona genu aromatazy
ASRM	Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu (ang. <i>American Society of Reproductive Medicine</i>)
ATF-1	czynnik aktywujący transkrypcję-1 (ang. <i>activating transcription factor-1</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
Bcl-2	chłoniak z komórek B-2 (ang. <i>B-cell lymphoma 2</i>)
C	cytozyna
c3	kaspaza-3 (ang. <i>caspase-3</i>)
CaCl ₄	czterochlorek wapnia
CAD	DNaza aktywowana kaspazą (ang. <i>caspase-activated DNase</i>)
cAMP	cykliczny adenzyno-3'5'-monofosforan
CatSper	kationowe kanały plemnika (ang. <i>cation channels of sperm</i>)
CCR5	receptor C-C chemokin typu 5 (ang. <i>C-C chemokine receptor type 5</i>)

c-FLIP	komórkowe białko hamujące podobne do FLICE (ang. <i>cellular FLICE-like inhibitory protein</i>)
cIAP1/2	komórkowy inhibitor białka apoptotycznego-1/-2 (ang. <i>cellular inhibitor of apoptosis protein-1/-2</i>)
CO ₂	dwutlenek węgla
CRISP	bogate w cysteinę białka wydzielnicze (ang. <i>cystein rich secretory proteins</i>)
DBD	domena wiążąca DNA (ang. <i>DNA binding domain</i>)
DEVD-FMK	inhibitor kaspazy-3
DISC	kompleks indukujący domenę śmierci (ang. <i>death-inducing signaling complex</i>)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
DNaza	deoksyrybonukleaza (ang. <i>deoxyribonuclease</i>)
dUTP	5'-trifosforan 2'-deoksyurydyny (ang. <i>2'-deoxyuridine-5'-triphosphate</i>)
E2	estradiol
EDTA	kwasy edetynowe
ERE	element odpowiedzi na estrogeny (ang. <i>estrogen response element</i>)
ESR	receptory estrogenowe
<i>ESR1</i>	gen kodujący receptor estrogenowy 1
ESR1	receptor estrogenowy 1 (ang. <i>estrogen receptor 1</i>)
<i>ESR2</i>	gen kodujący receptor estrogenowy 2
ESR2	receptor estrogenowy 2 (ang. <i>estrogen receptor 2</i>)
FADD	białko adaptorowe Fas przy interakcji z domeną śmierci (ang. <i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>)
FCGR2B	gen kodujący fragment Fc immunoglobuliny G, receptor o słabym powinowactwie IIb (ang. <i>Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor</i>)
FDU	ang. <i>fast digest unit</i>
FITC-DEVD-FMK	inhibitor kaspazy-3 skoniugowany z fluoresceiną
FL	kanał fluorescencyjny

FSC	sygnały rozproszone pod małym kątem (cytometria przepływowa; ang. <i>forward scatter</i>)
FSH	hormon folikulotropowy
G	guanina
GnRH	gonadoliberyna
HCG	ludzka gonadotropina kosmówkowa
HDL	lipoproteiny dużej gęstości (ang. <i>high density lipoproteins</i>)
HSP	białka szoku cieplnego (ang. <i>heat shock proteins</i>)
ICSI	docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika (ang. <i>intracytoplasmatic sperm injection</i>)
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. <i>insulin-like growth factor-1</i>)
IVF	zapłodnienie pozaustrojowe (ang. <i>in vitro fertilization</i>)
IVF-ET	zapłodnienie pozaustrojowe z transferem zarodka (ang. <i>in vitro fertilization - embryo transfer</i>)
LBD	domena wiążąca ligand (ang. <i>ligand binding domain</i>)
LDL	lipoproteiny małej gęstości (ang. <i>low density lipoproteins</i>)
LH	hormon luteinizujący
MAPK	kinaza aktywowana mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MgCl ₂	chlorek magnezu
MII	stadium metafazy II podziału redukcyjnego
MMP	błonowy potencjał mitochondrialny (ang. <i>mitochondrial membrane potential</i>)
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. <i>messenger ribonucleid acid</i>)
MUR	męski układ rozrodczy
NaCl	chlorek sodu
NaOH	wodorotlenek sodu
NCBI	ang. <i>National Center for Biotechnology Information</i>

NFκB	czynnik jądrowy κB (ang. <i>nuclear factor κB</i>)
NLS	sygnał lokalizacji jądrowej (ang. <i>nuclear localization signal</i>)
PCOS	zespół policystycznych jajników (ang. <i>polycystic ovary syndrome</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	PCR połączona z analizą restrykcyjną (ang. <i>restriction fragments length polymorphism</i>)
PI3K	kinaza trifosfatydylinozytolu (ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>)
PKA	kinaza białkowa A (ang. <i>protein kinase A</i>)
PKCs	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
PLC	fosfolipaza C (ang. <i>phospholipase C</i>)
PST	translokacja fosfatydylseryny (ang. <i>phosphatidylserine translocation</i>)
RIP	białko wchodzące w interakcję z receptorem (ang. <i>receptor-interacting protein</i>)
RNaza	rybonukleaza (ang. <i>ribonuclease</i>)
SHBG	globulina wiążąca hormony płciowe (ang. <i>sex hormone binding protein</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
Sp1	białko stymulujące-1 (ang. <i>stimulating protein 1</i>)
SSC	sygnały rozproszone pod dużym kątem (cytometria przepływowa; ang. <i>side scatter</i>)
T	tymina
TNF	czynnik nekrozy nowotworów (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
TNFR1	czynnik 1A z nadrodziny receptorów czynnika nekrozy nowotworów (ang. <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A</i>)
TRADD	białko adaptorowe dla TNF przy interakcji z domeną śmierci (ang. <i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i>)
TRAF2/5	czynnik związany z receptorem TNF 2/5 (ang. <i>TNF receptor-associated factor 2/5</i>)
TUNEL	ang. <i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling</i>

TVS	ultrasonografia przezpochwowa (ang. <i>trans-vaginal ultrasonography</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
ZP	osłonka przejrzysta (ang. <i>zona pellucida</i>)
α ERKO	mysz pozbawiona genu receptora estrogenowego 1
$\alpha\beta$ ERKO	mysz pozbawiona genu receptora estrogenowego 1 i 2
β ERKO	mysz pozbawiona genu receptora estrogenowego 1

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Niepłodność partnerska to schorzenie definiowane na podstawie wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*), w którym po roku regularnego współżycia bez stosowania środków antykoncepcyjnych nie dochodzi do ciąży. Według danych światowych, problem ten dotyczy około 15% par starających się o potomstwo (Boivin i wsp., 2007; McLaren, 2012). Czynniki męski stanowi przyczynę niepłodności w 40-60% przypadków i jego udział rośnie (Auger i wsp., 1995; Jensen i wsp., 2002; Merzenich i wsp., 2010; Aitken, 2013; Milewski i wsp., 2013). Jednak choć występowanie czynnika męskiego w niezamierzonej bezdzietności jest tak częste, to w większości przypadków molekularne podłoże tego zaburzenia jest nieznane (Jędrzejczak i wsp., 2005; Baker i wsp., 2012; Aitken i wsp., 2014). Poznanie przyczyn niepłodności męskiej może poszerzyć możliwości diagnostyczne tego schorzenia oraz prowadzić do poprawy wyników leczenia.

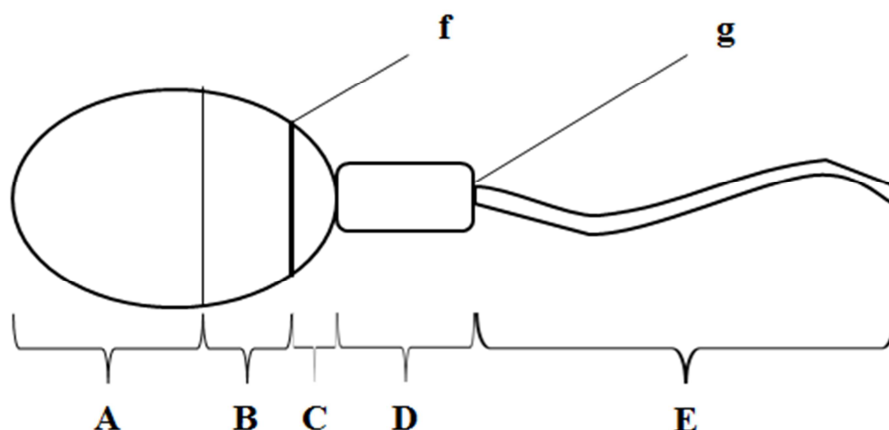
W ostatnich latach coraz większą wagę przywiązuje się do badania zdolności zapładniającej plemników męskich. Do czynników mogących ją modulować zalicza się między innymi czynniki genetyczne, wśród nich występowanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w obrębie genów istotnych dla męskiego układu rozrodczego. Rosnąca ilość badań wskazuje także na znaczącą rolę estrogenów w patofizjologii męskiego układu rozrodczego (MUR). Do syntezy tych hormonów dochodzi w jądrach - w komórkach Leydiga i Sertoliego, oraz w komórkach gametogenicznych (Bilinska i wsp., 2006; Carreau i wsp., 2012a). Receptory estrogenowe są rozmieszczone w wielu tkankach MUR, a ich ekspresja zmienia się w zależności od narządu oraz etapu rozwoju (Czupryńska, 2007). Aromataza P450

i receptory estrogenowe 1 i 2 (ESR1, ESR2)¹ są obecne także w samych plemnikach. Sugeruje się więc, że estrogeny mogą odgrywać istotną rolę w kształtowaniu wartości biologicznej nasienia. Biorąc pod uwagę istotną rolę, jaką w męskim układzie rozrodczym odgrywają estrogeny, postuluje się, że zaburzenia transdukcji sygnału estrogenowego związane z nieprawidłowością struktury ich receptorów mogą wpływać na pogorszenie funkcji gamet męskich. Nieprawidłowa struktura receptorów estrogenowych może być spowodowana polimorfizmami kodujących je genów. Do wykładników obniżonej wartości biologicznej nasienia należeć mogą: pogorszenie parametrów seminologicznych, podwyższony odsetek plemników z wykładnikami apoptozy i obniżona zdolność penetracji oocytu. To zaś może skutkować pogorszeniem wyników leczenia niepłodności, w tym coraz szerzej wykorzystywanych metod wspomaganego rozrodu takich jak zapłodnienie pozaustrojowe (IVF; ang. *in vitro fertilization*), a w szczególności docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika (ICSI; ang. *intracytoplasmatic sperm injection*).

1.2. Struktura plemnika i jego funkcja w procesie zapłodnienia

Plemnik ludzki charakteryzuje się dużą heterogennością błony komórkowej, którą podzielić można na pięć integralnych domen (Rycina 1.1.). Trzy z nich znajdują się w obrębie główki. Są to: region akrosomalny, okolica równikowa i domena postakrosomalna. Pozostałe dwie należą do wstawki i są to wstawka i część główna wstawki (Jones, 1998; Lenzi i wsp., 2002). Nie są do końca jasne mechanizmy utrzymujące niezależność domen. Oprócz pierścienia tylnego między częścią równikową i postakrosomalną oraz obręczy pierścieniowatej na granicy wstawki i części głównej wstawki nie istnieją bowiem wyraźne struktury graniczne między nimi. Prawdopodobnie heterogenność błony komórkowej gamety zależna jest od występujących między glikokaliksem a błoną oddziaływań elektrostatycznych, obecności tratw lipidowych i elementów cytoszkieletu gamety (Flesch i wsp., 2000; Shadan i wsp., 2004).

¹ Nomenklatura receptorów estrogenowych oraz kodujących je genów jest niejednorodna. W piśmiennictwie pojawiają się takie pozycje jak „receptory estrogenowe typu 1 i typu 2” oraz „receptory estrogenowe alfa i beta”. W świetle najnowszych zaleceń dotyczących nazewnictwa zdecydowano się na jednorodne określanie receptorów estrogenowych jako „receptory estrogenowe 1 i 2, ESR1 i ESR2”, zaś kodujące je geny jako „*ESR1* i *ESR2*”.



Rycina 1.1. Domeny błony komórkowej gamety męskiej; A – region akrosomalny, B – domena równikowa, C – domena postakrosomalna, D – wstawka, E – część główna wtki; f – pierścień tylny, g – obręcz pierścieniowata.

Część lipidowa błony komórkowej plemnika składa się w 70% z fosfolipidów, w 25% z lipidów obojętnych i w 5% z glikolipidów (Flesch i wsp., 2000). Rozmieszczenie fosfolipidów w błonie komórkowej jest asymetryczne – do warstwy zewnętrznej należy sfingomielina oraz główny fosfolipid błony plemników - fosfatydylocholina, zaś do wewnętrznej – fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolamina (Flesch i wsp., 2000). Wśród lipidów obojętnych największą rolę odgrywa cholesterol, mogący wpływać na hamowanie reakcji kapacytacji. Jego zawartość w błonie zależy od etapu rozwoju plemnika (Lenzi i wsp., 1996; Keber i wsp., 2013). Ponadto do błonowych lipidów obojętnych należą desmosterol i estry cholesterolu. Obecność glikolipidów wykazano zwłaszcza w zewnętrznej błonie gamety męskiej. 3'-sulfogalaktozyloglicerolipid występuje w okolicy akrosomalnej błony i jego rola nie jest jasna, polega prawdopodobnie na jej stabilizowaniu (Flesch i wsp., 2000). Błona komórkowa plemników zawiera także składową białkową, a rozmieszczenie białek jest powiązane z pełnioną przez nie funkcją. Białka wiążące komórkę jajową (ang. *egg-binding protein on sperm*) znajdują się w okolicy akrosomalnej. Należą do nich między innymi byndyna, fukozylotransferaza, plemnikowe białka sp56 i sp95, białko wiążące galaktozę i białko wiążące mannozę, spermadhezyna, zonadhezyna, fosfolipaza A2. W procesie fuzji z oocytem udział biorą między innymi białka wewnątrz błonowe z grupy ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase*) o właściwościach proteaz i białek adhezyjnych, wśród nich cyritesteina i fertilina, a także białka z rodziny CRISP (Cho, 2012). Z procesem dekapacytacji umożliwiającym reakcję kapacytacji wiążą się

białka HE4 i białko HE1, regulujące liczbę i rozmieszczenie tratw lipidowych (Tanphaichitr i wsp., 2007; Kawano i wsp., 2011).

Budowa plemnikowego jądra komórkowego jest także wysoce specyficzna. DNA jest upakowane w formie pseudokrystalicznej. Zostały z niego usunięte prawie wszystkie białka właściwe dla konwencjonalnej struktury chromatyny w komórkach somatycznych. Regularna forma nici DNA utrzymywana jest w głównej mierze nie przez histony, a przez protaminy 1 i 2 (Szczygieł, 2002). W plemnikach znajduje się 5-15% właściwych dla komórek somatycznych rezydualnych histonów tworzących nukleosomy i zawierających heterochromatynę. Są one usytuowane na krawędziach skondensowanego jądra komórkowego. Ponadto chromosomy rozmieszczone są w ten sposób, że centromery znajdują się w środku jądra, a telomery na jego obwodzie. Ta kondensacja genomu, powodująca zmniejszenie objętości jądra do około 5% objętości jądra komórki somatycznej, umożliwia łatwiejszy jego transport oraz częściowo pełni funkcję ochronną przed endonukleazami i wolnymi rodnikami tlenowymi, uniemożliwia jednak transkrypcję (Anand-Ivell i wsp., 2011). Istnieją badania potwierdzające podwyższoną dekondensację genomu plemnikowego u pacjentów z niepłodnością (Grunewald i wsp., 2009b).

Organella komórkowe plemnika są również znacznie zredukowane pod względem ilości w porównaniu do komórek somatycznych. Należą do nich: akrosom, mitochondria i elementy cytoszkieletu umożliwiające poruszanie się gamet. Akrosom bierze udział w reakcji akrosomalnej i procesie funkcji gamety męskiej z żeńską. Mitochondria, pełniące kluczową rolę w produkcji energii niezbędnej do prawidłowego poruszania się gamety, skoncentrowane są w okolicy wstawki. Prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów zapewniających ruchliwość komórek jest konieczne dla pełnionej przez plemnik funkcji zapładniającej (Grunewald i wsp., 2006b; Sousa i wsp., 2011).

1.3. Mechanizmy śmierci plemników

W wyniku ejakulacji, do dróg rodnych kobiety zostaje uwolnionych kilka do kilkunastu milionów plemników. Do zapłodnienia komórki jajowej dochodzi przy udziale jednego z nich. Nie jest do końca jasne, co dzieje się z pozostałymi gametami. Ich usuwaniu nie towarzyszą objawy stanu zapalnego. Prawdopodobnie mechanizmy śmierci plemników są nieco odmienne od mechanizmów śmierci komórek

somatycznych, choć na różnych etapach funkcjonowania gamet męskich można w nich obserwować wykładniki apoptozy typowe dla komórek somatycznych.

1.3.1. Apoptoza w komórkach somatycznych

Komórki mogą obumierać w dwóch głównych mechanizmach – na drodze apoptozy i nekrozy. Termin apoptoza, definiujący zaprogramowaną śmierć komórki, został po raz pierwszy użyty w 1972 roku przez Kerr i wsp. (Kerr i wsp., 1972). Jest to fizjologiczny lub patologiczny proces wchodzący w skład mechanizmów regulacyjnych dla wzrostu i dojrzewania organizmów. Apoptoza podlega kontroli komórki i nie wywołuje stanu zapalnego, gdyż nie powoduje uwolnienia istoty wewnątrzkomórkowej do ustroju. Zapewnia homeostazę kontrolując populację komórek oraz pełni rolę ochronną ustroju eliminując komórki uszkodzone (Norbury i wsp., 2001; Norbury i wsp., 2004). Proces ten odgrywa istotną rolę w morfogenezie tkanek podczas rozwoju, zapewniając homeostazę komórkową także w obrębie komórek germinalnych (Aitken i wsp., 2011a). Sposób inicjacji apoptozy jest specyficzny dla tkanek i komórek, zależy także od etapu rozwoju organizmu i integralności komórki.

Główną komponentą procesu jest proteolityczny układ do którego należy rodzina proteaz nazywanych kaspazami. Kaspaza-3 (c3) jest proteazą cysteinową, która rozszczepia białka i jest mediatorem większości etapów prowadzących do programowanej śmierci komórki (Ashkenazi i wsp., 1998; Brill i wsp., 1999).

Morfologicznie apoptoza przebiega w kilku etapach. Początkowe zmiany to widoczne w mikroskopie świetlnym zmniejszenie objętości komórki z ciaśniejszym upakowaniem organelli komórkowych, oraz charakterystyczna dla apoptozy pyknoza, będąca wynikiem kondensacji chromatyny. Pyknoza, obserwowana w mikroskopie elektronowym, widoczna jest jako skondensowane fragmenty chromatyny jądrowej na obrzeżach jądra komórkowego. W dalszym etapie błona komórkowa ulega silnemu pofałdowaniu, następuje karioreksja (fragmentacja jądra komórkowego) oraz przebudowa szkieletu komórkowego. W procesie nazywanym pączkowaniem (ang. *budding*) wytwarzane są ciała apoptotyczne. Mogą one zawierać fragmenty cytoplazmy, organella komórkowe lub fragmenty jądrowe. W ostatnim etapie ciała apoptotyczne ulegają fagocytozie przez makrofagi (Hochreiter-Hufford i wsp., 2013).

W komórkach somatycznych apoptoza jest regulowana na poziomie błonowym (mechanizm zewnątrzkomórkowy, zewnątrzpochodny) i cytoplazmatycznym (mechanizm wewnątrzkomórkowy, wewnątrzpochodny).

Zewnątrzkomórkowy sygnał o śmierci komórki przekazywany jest przez błonowe receptory śmierci wchodzące w skład rodziny czynnika nekrozy nowotworów (TNF; ang. *tumor necrosis factor*). Białka tej grupy zbudowane są z bogatej w cysteinę domeny zewnątrzkomórkowej oraz wewnątrzkomórkowego fragmentu długości około 80 aminokwasów, nazywanego „domeną śmierci” (ang. *death domain*) (Hymowitz i wsp., 2010; Li i wsp., 2013). Do białek będących receptorami śmierci należą między innymi TNFR1 oraz Fas. Ligand FasL wiąże się do zewnątrzkomórkowej domeny Fas, co wywołuje rekrutację białka adaptorowego FADD poprzez interakcję z domeną śmierci. FADD zbudowane jest z domeny śmierci oraz domeny efektorowej, poprzez którą w wyniku dimeryzacji rekrutuje prokaspazę-8 i prokaspazę-10 (Li i wsp., 2013). Powstaje „kompleks indukujący sygnał śmierci” (DISC, ang. *death-inducing signaling complex*) wywołując aktywację prokaspaz poprzez autokatalizację (Kischkel i wsp., 1995). W przypadku TNFR1, po związaniu liganda fragment cytoplazmatyczny tworzy kompleks zawierający TRADD, TRAF2/5, cIAP1/2 oraz RIP1. Po dalszej obróbce RIP1 i RIP3 są przyłączane wraz z TRADD do FADD, który rekrutuje prokaspazę-8 i umożliwia apoptozę komórki (Wang i wsp., 2008; He i wsp., 2009). Apoptoza w tym mechanizmie jest regulowana przez białko c-FLIP, wiążące się z kompleksem FADD oraz prokaspazy, prowadzące do jego dezaktywacji (Elmore, 2007). Aktywacja kaspazy-8 skutkuje aktywacją kaspazy-3 i -7. Następujące po niej zmiany strukturalne i biochemiczne prowadzą do śmierci komórki.

Droga wewnątrzkomórkowa może być aktywowana po uszkodzeniu DNA, na przykład w wyniku hipoksji, przegrzania, napromieniowania, działania wolnych rodników tlenowych lub wirusów. Obok mechanizmów naprawczych komórki aktywowane są także białka proapoptotyczne. Wbudowują się one w błonę wewnętrzną mitochondriów i zwiększają jej przepuszczalność dla jonów wodorowych. Prowadzi to do redukcji potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej i upośledzenia funkcjonowania łańcucha oddechowego, a w konsekwencji niewystarczającej produkcji ATP. Zwiększona przepuszczalność błony umożliwia także napływ jonów wapniowych do wnętrza komórki, a to wywołuje uwolnienie do cytoplazmy cytochromu C. Cytochrom C aktywuje mitochondrialny szlak kaspazozależny apoptozy, wiążąc i aktywując apoptotyczny czynnik aktywujący proteazę (Apaf-1; ang. *apoptotic*

protease activating factor-1) oraz prokaspazę-9 i formując apoptosom. Na drodze mitochondrialnej, w dalszym etapie, uwalniane mogą być także takie białka jak czynnik indukujący apoptozę (AIF, ang. *apoptosis inducing factor*), endonukleaza G i DNaza aktywowana kaspazą (CAD; ang. *caspase-activated DNase*). Kontrola i regulacja wewnątrzpochodnej drogi aktywacji apoptozy podlega białkom z grupy Bcl-2 oraz białku p53 i opiera się na relacjach czynników pro- i antyapoptotycznych (Adams i wsp., 2002; Cory i wsp., 2002).

Mechanizmy zewnętrz- i wewnątrzpochodny są ze sobą połączone i mogą na siebie wzajemnie oddziaływać. Może je także łączyć szlak egzekucyjny aktywowany przez kaspazę -3, -6 i -7 (Igney i wsp., 2002). Kaspaza-3 wydaje się być najistotniejszym elementem szlaku egzekucyjnego apoptozy i jest aktywowana jedynie przez jedną z kaspaz inicjujących – kaspazę-8, -9 lub -10. Wywołuje ona aktywację CAD, która wywołuje proteolityczną kaskadę zdarzeń – aktywację dalszych prokaspaz, fragmentację DNA, zniszczenie białek budulcowych komórki, pączkowanie i wreszcie ekspresję ligandów umożliwiających komórkom żernym ostateczne wchłonięcie ciałek apoptotycznych. Jednym z kluczowych substratów dla kaspazy-3 jest białko wiążące aktywną – gelsolina. Rozpoznanie i wchłonięcie ciałek apoptotycznych jest możliwe dzięki zburzeniu symetrii błony komórkowej i eksternalizacji fosfatydyloseryny. Fosfatydyloseryna jest obecna w zewnętrznej błonie komórek na początku procesu apoptozy we wszystkich komórkach somatycznych. Występuje także w ciałkach apoptotycznych. Mechanizm translokacji fosfatydyloseryny z wewnętrznego do zewnętrznego listka błony komórkowej jest nie do końca poznany, jednak umożliwia fagocytozę komórek poddanych apoptozie bez wywołania stanu zapalnego (Elmore, 2007).

Z uwagi na nakładanie się apoptozy i nekrozy oraz możliwe trudności w rozróżnieniu tych dwóch procesów, badanie apoptozy wymaga określenia co najmniej dwóch jej wykładników, przy czym w eksperymentach najkorzystniejsze jest wykazanie wczesnego i późnego markera tego procesu (Elmore, 2007).

1.3.2. Apoptoza w plemnikach ludzkich

Plemniki, tak jak pozostałe komórki ustroju, mogą być usuwane na drodze apoptozy lub nekrozy. Dokładny mechanizm tego procesu jest jednak przyczyną kontrowersji pomiędzy badaczami, a jego istota nie jest do końca poznana.

Prawdopodobnie gamety męskie, znajdujące się po ejakulacji w żeńskich drogach rodnych, są rozpoznawane w wyniku masywnej infiltracji leukocytów i ulegają fagocytozie na ogromną skalę. Proces ten musi być efektywny i przebiegać bez produkcji wolnych rodników tlenowych czy cytokin prozapalnych. W literaturze opisywane jest zachodzące po stosunku zjawisko migracji neutrofilów do pochwy, szyjki i trzonu macicy oraz jajowodu. Postuluje się jednak, że fagocytoza części plemników w drogach rodnych nie zmniejsza potencjału zapładniającego mężczyzny (Mikulska i wsp., 1994; Matthijs i wsp., 2000; Eisenbach, 2003; Oren-Benaroya i wsp., 2007). Nie wiadomo jednak jak dotąd, co wywołuje migrację komórek żernych do dróg rodnych kobiety. Być może same plemniki wydzielają substancje stymulujące fagocytozę. Sugeruje się, że fagocytoza plemników ulegających apoptozie przebiega w myśl „teorii cichej fagocytozy”, której elementem jest ekspresja na powierzchni komórek markerów apoptotycznych, takich jak błonowa translokacja fosfatidyloseryny. Ułatwiają one fagocytom rozpoznanie i szybkie wchłonięcie oznaczonych komórek (Aitken i wsp., 2011b; Aitken i wsp., 2013a). Teorię tę zdaje się potwierdzać fakt, iż zarówno na komórkach fagocytujących, jak i na komórkach nabłonkowych pochwy oraz na komórkach gruczołowych jajowodu, szyjki i trzonu macicy znajdują się receptory dla fosfatidyloseryny (Botto, 2004; Wu i wsp., 2006).

Badanie apoptozy w ludzkich plemnikach oparte jest najczęściej na jej markerach obecnych także w komórkach somatycznych. Należą do nich: błonowa translokacja fosfatidyloseryny i aktywna forma kaspazy-3, a także zaburzenia potencjału mitochondrialnego (MMP; ang. *mitochondrial membrane potential*), fragmentacja DNA oraz obecność białek pro- i antyapoptotycznych (Sakkas i wsp., 1999; Sakkas i wsp., 2003; Barroso i wsp., 2006; Tesarik i wsp., 2006).

Apoptoza jest obecna podczas spermatogenezy i dotyczy komórek germinalnych już w okresie życia płodowego, gdy w jądrach konieczna jest optymalizacja proporcji tych komórek do komórek Sertoliego, co wiąże się z ich usuwaniem. Upośledzenie tego procesu prowadzi do niepłodności męskiej (Rodriguez i wsp., 1997). W dalszym etapie życia uszkodzone komórki germinalne także są usuwane na drodze apoptozy, co ogranicza udział uszkodzonego DNA w procesie zapłodnienia. Duża ilość apoptotycznych komórek germinalnych obserwowana u niepłodnych mężczyzn sugeruje rolę nasilonej apoptozy tych komórek w mechanizmie niepłodności. Sugerowano także związek uszkodzeń DNA plemników z obecnością aktywowanej

endogennej endonukleazy, której funkcja miałyby polegać na eliminacji uszkodzonych gamet z procesu zapłodnienia (Gorczyca i wsp., 1993).

Plemniki mężczyzn mogą zawierać nieprawidłowości obejmujące zmienioną budowę chromatyny, aneuploidie i uszkodzenia DNA (Barroso i wsp., 2000). Uszkodzenia struktury DNA mogą być spowodowane wolnymi rodnikami tlenowymi (powstającymi na przykład w wyniku promieniowania, przegrzania czy infekcji), ale mogą też być efektem samej apoptozy (Sakkas i wsp., 1999; Barroso i wsp., 2000; Sikora i wsp., 2006). Apoptoza w plemnikach potencjalnie inicjowana jest na kilku poziomach: na poziomie jąder (pod wpływem przegrzania, czynników toksycznych lub niedoborów hormonalnych), najądrzy (w wyniku wysyłania sygnałów proapoptotycznych przez nieprawidłowe komórki lub w wyniku działania cytokin prozapalnych) lub ejakulatu (na przykład w wyniku braku antyoksydantów). Może być także wynikiem działania substancji pochodzących z żeńskich dróg rodnych (Eley i wsp., 2005; Gallegos i wsp., 2008; Aitken i wsp., 2011b).

1.3.3. Apoptoza plemników a płodność męska

W ostatnich latach prowadzonych jest coraz więcej badań nad związkiem apoptozy plemników z płodnością męską. Stwierdzono podwyższoną apoptozę u pacjentów po wazektomii oraz u cierpiących na żylaki powrózka nasiennego (Marmar, 2001; Chang i wsp., 2010; La Vignera i wsp., 2012). Wraz z poszerzaniem badań apoptozy w gametach męskich zaczęły się pojawiać sprzeczne dane dotyczące jej związku z parametrami nasienia. Oosterhuis stwierdził negatywną korelację ruchliwości i koncentracji plemników z występowaniem gamet z błonową PST (Oosterhuis i wsp., 2000). Paasch i wsp. stwierdzili podwyższony odsetek plemników z aktywną formą kaspazy-3 u pacjentów nieplodnych w porównaniu z płodnymi mężczyznami w grupie kontrolnej, a Weng i wsp. stwierdzili podwyższoną fragmentację DNA i częstsze występowanie PST w komórkach z aktywną formą kaspazy-3 (Weng i wsp., 2002; Paasch i wsp., 2003). Z drugiej strony Ricci i wsp. w 2002 roku nie stwierdzili związku wykładników apoptozy z żadnym z podstawowych parametrów nasienia, związku tego nie potwierdzili też inni badacze (Barroso i wsp., 2000; Ricci i wsp., 2002). Wykryto, że większość gamet wykazujących PST było komórkami zaliczanymi w ocenie mikroskopowej do komórek żywych (Kotwicka i wsp., 2008). Plemniki z PST miały niższą ruchliwość ruchem postępowym. Sugerowano więc, że zmiany ruchliwości

plemników mogą być spowodowane wynikającym z procesów apoptotycznych obniżeniem komórkowego poziomu ATP (Kotwicka i wsp., 2011b). W toku dalszych badań stwierdzono, iż selekcja komórek bez markerów apoptozy może zwiększyć szansę na powodzenie ICSI, zaś na modelu komórki jajowej chomika pozbawionej osłonki przejrzystej stwierdzono, że podwyższony odsetek plemników apoptotycznych może obniżać zdolność penetracji oocytu przez gametę męską (Dirican i wsp., 2008; Grunewald i wsp., 2008). Nie publikowano jak dotąd badań nad zależnością występowania PST i aktywnej formy c3 w plemnikach męskich oraz skuteczności zapłodnienia ludzkiego oocytu. Wydaje się, że idealne do tego typu badań są modele IVF i ICSI. Dają one możliwość prześledzenia krok po kroku roli plemnika na każdym etapie zapłodnienia oraz zidentyfikowania etapu zapłodnienia potencjalnie ulegającego upośledzeniu

w wyniku nieprawidłowej funkcji gamety męskiej.

Apoptozie plemników może także towarzyszyć fragmentacja DNA, mogąca prowadzić do upośledzenia płodności i procesów przedimplantacyjnych, nieprawidłowego rozwoju zarodkowego, niskiego odsetka zagnieżdżania oocytów i zwiększonej liczby poronień (Bonduelle i wsp., 2002; Aitken i wsp., 2007, 2010a).

1.4. Zapłodnienie

Męskie plemniki są produkowane w jądrach, w regulowanym przez gonadotropiny procesie, jakim jest spermatogeneza. W warunkach fizjologicznych, po ejakulacji, nasienie dostarczane jest do żeńskich dróg rodnych, gdzie plemniki przemieszczają się w kierunku komórki jajowej. Plemniki po ejakulacji nie są zdolne do zapłodnienia oocytu. Aby nabyć tej zdolności musi się najpierw dokonać reakcja kapacytacji. Jest to proces obejmujący szereg skomplikowanych reakcji fizjologicznie dokonujących się wstępnie przy kontakcie ze śluzem szyjkowym, a następnie podczas przemieszczania się gamety przez żeńskie drogi rodne w kierunku komórki jajowej. Jego istotą jest proteoliza czynników dekapacycyjnych (Aitken i wsp., 2013c). Kolejnym etapem zapłodnienia jest reakcja akrosomalna, a następnie dochodzi do fuzji gamety męskiej z żeńską.

Choć reakcję kapacytacji po raz pierwszy opisano ponad sześćdziesiąt lat temu, dokładny jej mechanizm nie został wyjaśniony (Chang i wsp., 1951; Aitken i wsp., 2013c). Składa się na nią szereg reakcji biochemicznych i molekularnych, w których

efekcie plemniki nabierają zdolności do kontaktu z wieńcem i osłonką przejrzystą (ZP – ang. *zona pellucida*) oocytu. Należą do nich: regulowany pod wpływem znajdujących się w śluzie szyjkowym albumin i lipoprotein dużej gęstości (HDL) wypływ cholesterolu z wewnętrznej błony komórkowej, co zwiększa jej płynność i przepuszczalność dla wodorowęglanów i jonów wapniowych, hiperpolaryzacja błony komórkowej, zwiększenie fosforylacji tyrozyny i aktywności kinaz białkowych, zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu wodorowęglanów, wapnia oraz cyklicznego adenozy-3'5'-monofosforanu (cAMP) i podwyższenie wewnątrzkomórkowego pH (Flesch i wsp., 2000; Flesch i wsp., 2001; Signorelli i wsp., 2012). Kapacytacja wiąże się z dwiema fazami: szybką i wolną. Szybka mediowana jest przez aktywację kinazy białkowej A (PKA; ang. *protein kinase A*) pod wpływem jonów wapniowych i rozpuszczalnej, zależnej od wodorowęglanów cyklazy adenyłowej. Następuje bezpośrednio po opuszczeniu przez nasienie najądrzy i charakteryzuje się gwałtownymi, asymetrycznymi ruchami witki. Poziom cAMP wzrasta około 60 sekund po kontakcie z wodorowęglanami do poziomu maksymalnego, a po około 90 sekundach zaczyna się zależna od PKA fosforylacja tyrozyny. Poziom fosforylacji tyrozyny koreluje ze skutecznością połączenia plemnika z komórką jajową. PKA jest także związana z regulacją ruchliwości gamety (Liu i wsp., 2006; Jones i wsp., 2008; Ickowicz i wsp., 2012). Faza wolna rozpoczyna się wraz z wypływem cholesterolu i wiąże ze zmianą wzorca ruchowego plemnika prowadzącą do jego hiperaktywacji, co ma na celu osiągnięcie przez plemnik odpowiedniej energii dla penetracji osłonki przejrzystej oocytu (Visconti, 2009; Okabe, 2013). Gwałtownym ruchom witki towarzyszy wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapniowych. Jest on kontrolowany prawdopodobnie przez specyficzne dla gamet męskich, aktywowane przez progesteron (także ten znajdujący się w płynie pęcherzykowym) kanały jonowe CatSper (Chang i wsp., 2011). Inaktywacja kanałów CatSper prowadzi do niepłodności (Avenarius i wsp., 2009). Zmiana wzorca ruchowego plemnika może być także mediowana przez zależną od aktyny polimeryzację fosfolipazy-D (Itach i wsp., 2012).

Dojrzały, zdolny do zapłodnienia oocyt znajduje się w stadium metafazy II podziału mejotycznego. Osłonka przejrzysta jest zewnątrzkomórkowym płaszczem zbudowanym z glikoprotein otaczającym oocyt. Macierz ZP odgrywa kluczową rolę w zapłodnieniu będąc substratem dla wiązania plemnika oraz agonistą regulowanej egzocytozy pęcherzyka akrosomalnego w plemniku, pełniąc również rolę ochronną

przed polispermia oraz zapewniając tworzącemu się zarodkowi właściwe warunki do czasu implantacji w błonie śluzowej endometrium (Wassarman, 2008; Wassarman i wsp., 2008). Ludzka macierz ZP zbudowana jest z czterech glikoprotein – ZP1, ZP2, ZP3 i ZP4 (Louros i wsp., 2013). ZP3 jest gatunkowo specyficzna. Wiąże się z plemnikiem po jego kapacytacji i doprowadza do akrosomalnej egzocytozy. ZP4 wiąże się do przedniej części poddanej kapacytacji gamety męskiej i także indukuje akrosomalną egzocytozę. Heterodimery ZP2-ZP3 łączone są prawdopodobnie przez ZP1, zaś sama ZP2 pełni raczej rolę receptora drugorzędowego, nie mając bezpośredniego wpływu na reakcję akrosomalną (Wassarman, 2008; Ganguly i wsp., 2010; Gadella, 2012). W samym plemniku reakcja akrosomalna charakteryzuje się utratą akrosomu i uwolnieniem enzymów umożliwiających wniknięcie do oocytu (Grunewald i wsp., 2006a; Govindaraju i wsp., 2012). Towarzyszy temu falowe napływanie jonów wapniowych z retikulum endoplazmatycznego do cytoplazmy (Swann i wsp., 2008). Nawracające oscylacje poziomu wapnia depolaryzują oocyt, co uniemożliwia wniknięcie kolejnych plemników do oocytu (tryb szybki blokowania polispermii), a następnie uwalniają leżące pod wewnętrzną błoną oocytu pęcherzyki kortykalkne, co prowadzi do modyfikacji ZP, czyniąc błonę oocytu ostatecznie nieprzepuszczalną dla innych gamet męskich (wolny tryb blokowania polispermii) (Abbott i wsp., 2001; Gardner i wsp., 2006). Zmiany stężenia jonów Ca^{++} prowadzą także do aktywacji oocytu inicjując kulminację mejozy i usunięcie drugiego ciała kierunkowego. Po około 16 do 18 godzinach po fuzji genomów ojcowskiego i matczynego dochodzi do formowania przedjądrzy i replikacji DNA. Ostatnim etapem połączenia plemnika i komórki jajowej jest syngamia zapewniająca diploidalny genom i formowanie zygoty.

1.4.1. Ocena funkcji zapładniającej plemnika

Z uwagi na złożoność procesu zapłodnienia, trudno jest wyznaczyć jednoznaczne parametry oznaczające funkcję zapładniającą gamety męskiej. Ze względu na dostępność i brak inwazyjności, podstawowa ocena funkcji zapładniającej plemnika obejmuje standardową analizę seminologiczną według zaleceń WHO z 2010 roku. Zgodnie z tymi zaleceniami, za dolną granicę koncentracji przyjmuje się 15 milionów plemników w mililitrze nasienia. Nasienie o prawidłowej ruchliwości ruchem postępowym charakteryzuje ruchliwość postępową co najmniej 32% gamet.

Dolny zakres wartości referencyjnych dla plemników o prawidłowej morfologii to 4%. Żywotność plemników oceniana przy pomocy testu hipoosmotycznego jest prawidłowa gdy wynosi co najmniej 58% (WHO, 2010). Dalszych informacji dostarczyć może badanie wykładników apoptozy plemników i wreszcie ocena wyników zapłodnienia porównując model klasyczny i mikroiniekcyjny zapłodnienia pozaustrojowego. Połączenie tych wszystkich metod podnosi wartość oceny zdolności zapładniającej plemnika.

1.5. Estrogeny w organizmie ludzkim

1.5.1. Rola estrogenów w ustroju

Do estrogenów produkowanych w organizmie ludzkim należą: estron, 17β -estradiol (E2) oraz estriol. Są to hormony steroidowe powstające z cholesterolu w wyniku aromatyzacji androgenów pod wpływem zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej enzymów z grupy cytochromu P450. Ostatni, nieodwracalny etap produkcji estrogenów to demetylacja zachodząca pod wpływem aromatazy P450 (Nelson i wsp., 2001). Estrogeny odróżnia między sobą ustawienie grup hydroksylowych oraz aktywność biologiczna. 17β -estradiol to hormon o najsilniejszym działaniu, produkowany w 95% przez komórki ziarniste jajnika, a także przez łożysko oraz tkankę tłuszczową w wyniku aromatyzacji dihydroandrostendionu i testosteronu oraz konwersję z estronu. Estron ma około 5-10 razy słabszą aktywność biologiczną i powstaje głównie na drodze obwodowej konwersji z androstendionu. Estriol jest najslabszym estrogenem, powstaje jako produkt metabolizmu estradiolu i estronu (Kuiper i wsp., 1997; Warenik-Szymankiewicz, 2003). Estrogeny są transportowane w formie związanej z białkami osocza – estradiol wiąże się z globuliną wiążącą hormony płciowe (SHBG; ang. *sex hormone binding protein*), a estron z albuminami. Ich aktywność biologiczna zachodzi jedynie w stanie wolnym. Dyfundują najpierw przez błonę komórkową komórek docelowych, a następnie oddziałują poprzez wewnątrzkomórkowe receptory estrogenowe (Warenik-Szymankiewicz, 2003).

Estrogeny mają szerokie spektrum działania. Są odpowiedzialne nie tylko za rozwój i regulację żeńskiego układu rozrodczego, ale wpływają także na szereg innych układów ludzkiego organizmu (Gustafsson, 2003). Ich najważniejsze funkcje w zależności od miejsca działania przedstawiono w tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Funkcja biologiczna estrogenów w organizmie ludzkim.

Układ	Funkcja estrogenów
Układ płciowy	<ul style="list-style-type: none"> - Pobudzanie rozwoju żeńskich narządów płciowych - Kształtowanie II- i III-rzędowych cech płciowych - Stymulacja proliferacji komórek podścieliska endometrium, wzrostu masy mięśniowej macicy oraz perystaltyki macicy i jajowodów - Pobudzanie rozwoju sutka oraz zewnętrznych narządów płciowych, przygotowanie sutków do laktacji (Feng i wsp., 2007) - Związek z rozwojem raka piersi, prostaty, macicy, jajnika i endometrium (Khan i wsp., 1998; Shaaban i wsp., 2002; Dey i wsp., 2013; Jarząbek i wsp., 2013)
Układ sercowo-naczyniowy	<p>Działanie kardioprotekcyjne poprzez:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Rozszerzanie naczyń krwionośnych (Farhat i wsp., 1996) - Obniżanie cholesterolu całkowitego, regulację stężeń lipoprotein o niskiej i wysokiej gęstości (LDL i HDL) (Lamon-Fava i wsp., 2010; Barros i wsp., 2011) - Stymulacja wydzielania insuliny u chorych na cukrzycę (Alonso-Magdalena i wsp., 2013)
Układ mięśniowo-szkieletowy	<p>Zapobieganie osteoporozie:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hamowanie powstawanie osteoklastów, stymulacja aktywności osteoblastów, zwiększanie uwalniania kalcytoniny - Kluczowy hormon w procesie mineralizacji kości w okresie dojrzewania - Utrzymywanie struktury i masy kości po menopauzie (Melville i wsp., 2013)
Układ nerwowy	<ul style="list-style-type: none"> - Regulacja aktywności neuronalnej i działanie neuroprotekcyjne (De Marinis i wsp., 2013; Spence i wsp., 2013) - Prawdopodobnie regulacja motywacji, procesów pamięciowych, koncentracji uwagi oraz agresji (potwierdzone występowanie receptorów estrogenowych w okolicy hipokampa)(Witty i wsp., 2013) - Różnicowanie zależnie od płci części mózgu odpowiedzialnych za zachowania płciowe i społeczne (hipokamp) (Ivanova i wsp., 2000; Scharfman i wsp., 2006)

1.5.2. Estrogeny w męskim układzie rozrodczym

Estrogeny kojarzone są głównie z żeńskimi hormonami płciowymi. Jednak od kiedy w 1934 roku Zondek wykazał ich obecność w moczu ogiera, a potem w 1962 roku Jayle i wsp. potwierdzili syntezę estrogenów w ludzkim jądrze, rośnie ilość doniesień potwierdzających nie tylko obecność, ale także ogromną rolę, jaką

hormony te odgrywają w męskim układzie rozrodczym (MUR) (Carreau i wsp., 2011b). Podstawowe funkcje jąder, a więc spermatogeneza i produkcja hormonów steroidowych, są kontrolowane nie tylko przez hormon luteinizujący (LH) i hormon folikulotropowy (FSH), ale także przez testosteron i czynniki produkowane miejscowo, wśród nich estrogeny. Wykazano obecność estrogenów oraz ich receptorów w tkankach MUR wielu ssaków. Obecność estrogenów w samych jądrach jest także dobrze udokumentowana. Stężenie tych hormonów w męskim nasieniu jest wyższe niż w osoczu kobiet (Hess i wsp., 1997). W toku dalszych badań stwierdzono występowanie aromatazy P450 w tkankach MUR, komórkach Sertoliego i Leydiga, komórkach gametogenicznych oraz plemnikach, co wskazuje na ich zdolność do produkcji estrogenów (Hess, 2003). Dowiedziono także, że modele myszy pozbawione aromatazy (ArKO) oraz receptorów estrogenowych (α ERKO, β ERKO) mają zaburzenia płodności, zaś u mężczyzn z deficytem aromatazy występuje obniżona ruchliwość plemników (Carreau, 2003). Badania na modelu sezonowo rozmnażającej się normicy rudej dowiodły, że ekspresja receptorów androgenowych, aromatazy P450 i ESR2 jest zależna od czasu ekspozycji na światło. Oznacza to, że jest ona większa u zwierząt wymagających do rozrodu dłuższej ekspozycji na światło, u których występuje w pełni rozwinięta spermatogeneza w porównaniu do zwierząt wymagających krótszej ekspozycji, gdzie jądra są gorzej rozwinięte (Bilinska i wsp., 2000; Bilinska i wsp., 2001). Estrogeny powodują także hamowanie wydzielania testosteronu w komórkach Leydiga, zakłócają rozwój płodowy tych komórek, hamują apoptozę postmeiotycznych komórek germinalnych oraz odpowiadają za zwiększenie ilości spermatogonii w jądrze (Carreau i wsp., 2011a; Carreau i wsp., 2012b). Ponadto potwierdzono, że podawanie samcom niewielkich dawek tych hormonów powoduje wznowienie spermatogenezy u szczurów, u których była ona upośledzona (Atanassova i wsp., 2000; Ebling i wsp., 2000). Doświadczenia te pozwalają postulować, że estrogeny są silnymi modulatorami funkcji męskiego układu rozrodczego, jednak dokładny mechanizm ich oddziaływania nie jest dokładnie poznany.

1.5.3. Mechanizmy działania estrogenów

1.5.3.1. Receptory estrogenowe

Działanie estrogenów na komórki docelowe zachodzi za pośrednictwem receptorów estrogenowych. W organizmie ludzkim wyróżnić można dwa typy

receptorów – receptor estrogenowy 1 (ESR1) i receptor estrogenowy 2 (ESR2). Są one kodowane przez odrębne geny i wykazują różną ekspresję zależną od rodzaju tkanki i okresu jej dojrzewania. W części narządów, na przykład w jajniku i macicy, sutku, płucach, miocytach i fibroblastach serca, pniu mózgu i rdzeniu kręgowym stwierdza się ekspresję zarówno ESR1 i ESR2, jednak w niektórych tkankach ekspresja jednego z receptorów może przeważać nad drugim. ESR1 jest receptorem dominującym między innymi w macicy, gruczole krokowym, komórkach tekalnych jajnika, kościach, sutku, komórkach mięsnych prostaty, mózgu, wątrobie i tkance tłuszczowej, zaś ESR2 w okrężnicy, nabłonku stercza, jądrach, komórkach ziarnistych jajnika, szpiku kostnym, śliniankach oraz nabłonku naczyniowym (Heldring i wsp., 2007; Nilsson i wsp., 2011; Dey i wsp., 2013). Postuluje się istnienie potencjału regulacyjnego ESR2 dla ekspresji i efektów działania ESR1 (Saunders, 2005).

ESR1 kodowany jest przez zbudowany z ośmiu eksonów, zawierający 472 929 par zasad gen *ESR1*. Znajduje się on w odcinku q24-q27 chromosomu 6.

Gen *ESR2* kodujący ESR2 jest zbudowany z dziewięciu eksonów. Zawiera 254 319 par zasad i został zmapowany w prążku q23-24.1 chromosomu 14 (Enmark i wsp., 1997; Tsukamoto i wsp., 1998; Khattry i wsp., 2009a).

Receptory estrogenowe zbudowane są z czterech funkcjonalnie odrębnych domen:

- N-końcowy region A/B, zawierający niezależny od liganda motyw AF-1 (ang. *activation function-1*) odpowiedzialny za aktywację transkrypcji i interakcje białko-białko, specyficzny dla tkanki i promotora; motyw AF-1 jest bardziej aktywny w ESR1 oraz różni się między ESR1 i ESR2 budową i długością łańcucha wykazując niską konserwatywność, co może być przyczyną odmiennej reakcji ESR1 i ESR2 na niektóre ligandy (na przykład 4-hydroxytamoxifen i raloxifen są częściowymi agonistami dla ESR1, ale antagonistami dla ESR2) (Weihua i wsp., 2003; Ascenzi i wsp., 2006),
- region C, nazywany też domeną DBD (ang. *DNA binding domain*), zawierający domenę wiążącą DNA, odpowiedzialną za dimeryzację receptora i przyłączenie kompleksu ligand-receptor; struktura ta jest konserwatywna w 96% dla obu receptorów i zawiera zduplikowany motyw wiążących DNA, powiązanych przez atom cynku czterech reszt

cysteinowych, porównywanych często do tzw. palców cynkowych, jednak nie posiadających trójwymiarowej struktury (Kumar i wsp., 1999),

- region D, nazywany domeną zawiasową – jak dotąd najgorzej poznany fragment, zawierający sygnał lokalizacji jądrowej NLS (ang. *nuclear localization signal*) oraz miejsca modyfikacji post-translacyjnej (Ascenzi i wsp., 2006),
- C-końcowy region E/F, zwany też fragmentem LBD (ang. *ligand binding domain*), zawiera motyw AF-2 (ang. *activation function-2*) odpowiedzialny za funkcję transkrypcyjną aktywowaną przez swoisty ligand; fragment ten zawiera białka opiekuńcze z rodziny białek szoku cieplnego (HSP; ang. *heat shock proteins*) takie jak HSP70 i HSP90; domena E pozwala na homo- i heterodimeryzację receptora; region E/F jest konserwatywny w 56% dla obu receptorów (Kumar i wsp., 1999; Ascenzi i wsp., 2006; Khattri i wsp., 2009a).

ESR należą do receptorów jądrowych i są czynnikami transkrypcyjnymi indukowanymi ligandem (Heldring i wsp., 2007). Działanie regulacyjne dla transkrypcji receptorów jest zależne od interakcji z odpowiednimi koaktywatorami dla stymulacji ekspresji poszczególnych genów lub z korepresorami dla jej inhibicji (genomowy mechanizm działania estrogenów poprzez ESR). Hormony te mogą także działać poprzez ESR w mechanizmie niegenomowym (Marino i wsp., 2006).

1.5.3.2. Genomowy mechanizm działania estrogenów

Genomowy mechanizm działania estrogenów powoduje modyfikację ekspresji specyficznych genów. Do działania genomowego dochodzi po około dwóch godzinach od stymulacji estrogenem (Ascenzi i wsp., 2006; Marino i wsp., 2006). Efekt ten powstaje po przyłączeniu kompleksu estrogen-ESR do regionu promotorowego genu docelowego w sposób bezpośredni lub za pośrednictwem interakcji typu białko-białko z czynnikami transkrypcyjnymi. Czynniki transkrypcyjne pełnią rolę łącznika między informacją zawartą w genomie, a wdrożeniem jej w funkcjonowanie komórki. ESR1 i ESR2 występujące w cytoplazmie komórek są nieaktywne. Ich aktywacja następuje po przyłączeniu odpowiedniego liganda, co po oddysocjowaniu białek opiekuńczych powoduje dimeryzację receptorów i ich stabilizację oraz umożliwia dalszy transport do jądra komórkowego (Sinkevicius i wsp., 2009). W klasycznym mechanizmie estrogeny

wpływają na genom komórkowy poprzez wiązanie dimerów ze swoistym, mającym strukturę palindromową elementem odpowiedzi na estrogeny (ERE; ang. *estrogen response elements*) (Klinge, 2001). Możliwe jest także działanie genomowe w mechanizmie alternatywnym, gdy struktura ERE odpowiada jedynie częściowo budowie klasycznego ERE, lub gdy po dimeryzacji receptora nie dochodzi do połączenia z ERE. Sytuacja ta dotyczy około 35% genów. Konieczny jest wtedy inny czynnik transkrypcyjny dla mediowania połączenia z DNA, działający na zasadzie koaktywatora lub korepresora. Wiąże się on do receptora lub do innych czynników transkrypcyjnych, prowadząc do interakcji z nimi., na przykład czynnik jądrowy κ B (NF κ B ang. *nuclear factor κ B*), białko stymulujące-1 (Sp1, ang. *stimulating protein 1*) czy czynnik aktywujący transkrypcję-1 (ATF-1, ang. *activating transcription factor 1*) (O'Lone i wsp., 2004; O'Lone i wsp., 2007). Do genów aktywowanych w tym mechanizmie należą między innymi geny kodujące: cyklinę D1, antyapoptotyczne białko-2 w chłoniaku z komórek B (Bcl-2), kolagenazę, owalbuminę i receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1, ang. *insulin-like growth factor-1*) (Marino i wsp., 2002; Fujimoto i wsp., 2004a; Fujimoto i wsp., 2004b; Marino i wsp., 2006). Oddziaływanie ligandów z receptorami estrogenowymi umożliwia stymulację lub hamowanie procesu transkrypcji (Paige i wsp., 1999). W mechanizmie genomowym może dochodzić także do autoregulacji ekspresji receptorów estrogenowych poprzez E2 i gonadotropiny (Weihua i wsp., 2003).

1.5.3.3. Niegenomowy mechanizm działania estrogenów

Działanie estrogenów w mechanizmie niegenomowym, zwanym też szybkim (ang. *rapid*) zachodzi po kilku-kilkudziesięciu sekundach od stymulacji estrogenem, prawdopodobnie poprzez receptory zlokalizowane w błonie komórkowej (Szego i wsp., 1967; Morley i wsp., 1992; Marino i wsp., 1998; Simoncini i wsp., 2004). Lokalizację w obrębie błony komórkowej wykazuje około 5-10% wszystkich ESR komórki (Levin, 2009). W dostępnym piśmiennictwie znaleźć można publikacje sugerujące, że receptory błonowe mają odmienną od klasycznych, choć bardzo do nich podobną budowę. Istnieją także prace potwierdzające obecność klasycznych jądrowych ESR1 i ESR2 w błonie komórkowej (Toran-Allerand i wsp., 2002; Marino i wsp., 2006). Klasyczne jądrowe ESR nie zawierają jednak typowych dla receptorów błonowych domen transbłonowych. Postuluje się więc, że są one jedynie zakotwiczone w błonie komórkowej albo związane

z innymi białkami błonowymi. Możliwe jest także istnienie wariantów splicingowych ESR skutkujących utworzeniem z tych receptorów integralnych białek transbłonowych (Kim i wsp., 1999).

Postuluje się, że alternatywą dla klasycznych ESR zlokalizowanych w błonie komórkowej może być zbudowany z siedmiu domen błonowy receptor estrogenowy GPR30 (Revankar i wsp., 2005). GPR30 biorą udział w szybkiej odpowiedzi komórek na estrogeny (Kelly i wsp., 1999). Obecność tych receptorów wykazano w błonie komórkowej i retikulum endoplazmatycznym komórek raka piersi (Thomas i wsp., 2005; Mo i wsp., 2013). Ich nasiloną ekspresja jest czynnikiem rokowniczo niekorzystnym w przebiegu raka płuc, raka endometrium i raka jajnika, a polimorfizmy kodującego je genu są związane z patofizjologią guzów o typie nasieniaków u mężczyzn (Jala i wsp., 2012; Wang i wsp., 2012; Petrie i wsp., 2013; Chevalier i wsp., 2014).

Sugeruje się, że E2 łącząc się z receptorem błonowym może indukować jedną z czterech ścieżek przekazywania sygnału: poprzez fosfolipazę C (PLC)/białkową kinazę C (PKCs), poprzez Ras/Raf/MAPK, poprzez kinazę trifosfatydyloinozytolu (PI3K)/AKT i wreszcie poprzez cAMP/PKA (Marino i wsp., 2006). Ścieżki te łączą się z kolejnymi łańcuchami metabolicznymi i uruchamiają dalszą kaskadę zdarzeń, na przykład aktywując receptor IGF-1 i dalej aktywację kinaz aktywowanych mitogenami MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) (Kahlert i wsp., 2000). Rodzaj aktywacji ścieżek przekazywania sygnału w komórce przez receptory estrogenowe jest swoisty dla poszczególnych tkanek, jednak funkcja receptorów błonowych i rola niegenomowego działania estrogenów w ustroju jest nadal nie do końca poznana i pozostaje przedmiotem dalszych badań (Ansonoff i wsp., 1998; Marino i wsp., 2006). Stwierdzono na modelu zwierzęcym silny udział receptorów błonowych w czynności nabłonka naczyniowego oraz jajników (wyłączenie receptorów błonowych prowadziło do upośledzenia funkcji jajnika i niepłodności u osobnika żeńskiego myszy) (Adlanmerini i wsp., 2014). Z uwagi na kondensację chromatyny uniemożliwiającą transkrypcję, w gametach męskich możliwy jest prawdopodobnie jedynie niegenomowy mechanizm działania receptorów estrogenowych (Luconi i wsp., 2004).

1.5.4. Receptory estrogenowe w męskim układzie rozrodczym

Receptor ESR1, został po raz pierwszy odkryty w 1950 roku przez Elwooda Jensena (Jensen, 1962; Jensen i wsp., 2010). W 1993 roku skonstruowano model genetyczny myszy pozbawionej genu *ESR1* (ang. *Estrogen receptor alpha knockout mouse*, α ERKO mouse). Na jego podstawie stwierdzono, że receptor ten nie jest niezbędny do życia, jednak pozbawienie *ESR1* osobników męskich prowadzi do upośledzenia spermatogenezy i pogorszenia płodności ze względu na atrofię jąder. Jest ona między innymi wynikiem poszerzenia kanalików wyprowadzających jądra spowodowanego zaburzoną resorpcją płynu. Nasienie uzyskane od α ERKO miało obniżoną ruchliwość i koncentrację, a w doświadczeniach w warunkach *in vitro* plemniki nie zapładniały komórki jajowej. Dojrzałe męskie osobniki myszy pozbawionych *ESR1* wykazywały ponadto obniżoną liczbę kopulacji w stosunku do osobników mających ten receptor (Lubahn i wsp., 1993; Eddy i wsp., 1996; Arao i wsp., 2012). W toku dalszych badań dowiedziono, że w warunkach fizjologicznych zagęszczanie nasienia w nasieniowodach jest efektem działania ESR1 niezależnego od ligandu, zaś odpowiedź na połączenie receptora z estrogenem to stymulacja rozwoju i/lub żywotności komórek germinalnych (Sinkevicius i wsp., 2009). W 1996 roku odkryto ESR2 kodowany przez gen *ESR2*, a w konsekwencji stworzono modele myszy pozbawionej *ESR2* (β ERKO; ang. *Estrogen receptor beta knockout mouse*) oraz pozbawionej *ESR1* i *ESR2* ($\alpha\beta$ ERKO; ang. *Estrogen receptor alpha and beta knockout mouse*). Mysz płci żeńskiej pozbawiona *ESR2* miała niższy potencjał rozrodczy. U osobników męskich nie stwierdzono jednak pogorszenia płodności, jedynie przerost pęcherza i prostaty (Krege i wsp., 1998).

Rozmieszczenie i ekspresja receptorów estrogenowych w męskim układzie rozrodczym są zależne nie tylko od rodzaju narządu, ale także od etapu rozwoju poszczególnych narządów (Tabela 1.2.). Rozpowszechnienie ESR w MUR potwierdza dużą rolę, jaką estrogeny odgrywają w fizjologii męskiej płodności.

Tabela 1.2. Rozmieszczenie ESR1 i ESR2 w męskim układzie rozrodczym w zależności od rodzaju narządu i etapu rozwoju (według (Czupryńska, 2007) i (Filipiak i wsp., 2012))

	Tkanka płodowa		Tkanka noworodkowa		Tkanka dojrzała	
	ESR1	ESR2	ESR1	ESR2	ESR1	ESR2
Komórki Leydiga	+	++	++	++	+/-	++
Komórki Sertoliego	-	++	-	++	+/-	++
Przewodziki odprowadzające	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Komórki plemnikotwórcze	-	+++	-	++	-	+++
Komórki nabłonkowe najądrza	-	++	-	++	-	+++
Nasieniowód	-	++	-	++	-	+++
Pęcherzyk nasienny	?	?	+	++	+	++
Prostata	?	?	+	++	+	+++

ESR1 – receptor estrogenowy 1, ESR2 – receptor estrogenowy 2, + słaba ekspresja, ++ średnia ekspresja, +++ silna ekspresja, +/- część komórek wykazuje ekspresję, ? brak danych

Także w samej gamecie męskiej potwierdzono obecność ESR1 i ESR2 zarówno w dojrzałych plemnikach jak i na różnych etapach spermatogenezy. Oba receptory zlokalizowano w spermatogoniach i dojrzałych spermatydach. ESR1 znajduje się ponadto w spermatocytach I i II rzędu, zaś ESR2 jest dominującym receptorem estrogenowym w spermatogoniach (Pentikainen i wsp., 2000; O'Donnell i wsp., 2001). Doniesienia dotyczące ich dokładnej topografii w obrębie dojrzałej gamety nie są jednoznaczne. Aquila i wsp. wykazali obecność ESR1 w okolicy wstawki zaś ESR2 w witce plemnika (Aquila i wsp., 2004). Solakidi i wsp. wykryli ESR1 w okolicy równikowej gamety, a ESR2 w jej wstawce (Solakidi i wsp., 2005). Obecność receptorów estrogenowych w okolicy wstawki i witki, gdzie skoncentrowane są odpowiedzialne za dostarczanie energii plemnikom mitochondria sugeruje, że ich aktywność i funkcja w zakresie prawidłowej transdukcji sygnału estrogenowego może mieć istotny wpływ na ruchliwość, a w związku z tym także na zdolność zapładniającą plemników (Lazaros i wsp., 2010).

Wielokierunkowość działań estrogenów w męskim układzie rozrodczym, a także szerokie rozpowszechnienie ich receptorów w gametach oraz narządach MUR zachęca do dalszych badań nad istotą zależności tych hormonów i funkcji plemników męskich.

1.6. Polimorfizmy genetyczne i ich związek z podatnością na choroby

Warianty DNA występujące u więcej niż 1% populacji nazywane są polimorfizmami genetycznymi (Chakravarti, 1999). Wpływ polimorfizmów na zmianę fenotypu czy podatność na choroby jest zmienny i zależny od lokalizacji polimorfizmu w genomie, szczególnie w zależności od umiejscowienia w obrębie sekwencji kodujących lub niekodujących. Najczęstszym typem polimorfizmu jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*). Pozostałe polimorfizmy mogą powstawać w wyniku delecji lub insercji sekwencji kilku nukleotydów, lub duplikacji albo delecji większych fragmentów DNA. Mogą się pojawiać także SNP krótkich fragmentów tandemowych.

Polimorfizmy pojedynczych nukleotydów powstają najczęściej jako efekt nieprawidłowej replikacji albo naprawy DNA. Mogą być związane z różnymi fenotypami, a także ze zwiększoną podatnością lub odpornością na choroby (Collins, 1997). W przypadku niektórych chorób genetycznych mogą służyć jako markery genetyczne (Wang i wsp., 1998; Chakravarti, 1999). SNP mogą wpływać na metabolizm ustroju poprzez zmianę produktu białkowego lub, w przypadku receptorów – zmianę ich ekspresji. Większość SNP występuje w sekwencjach niekodujących. Lokalizacja w nie poddanych translacji 5'-regionach regulatorowych może zaburzać regulację transkrypcji genu. Na przykład receptor hamujący FcRIIb (fragment Fc immunoglobuliny G, receptor o słabym powinowactwie Iib; ang. *Fc fragment of immunoglobulin G, low affinity Iib receptor*) jest negatywnym regulatorem produkcji przeciwciał w procesie odpornościowym. Polimorfizm G→C w ludzkim genie promotorowym *FCGR2B* jest związany z wystąpieniem toczenia rumieniowatego układowego. Tranzycja G→C prowadzi do kompetytywnej interakcji czynnika transkrypcyjnego Yin-Yang1 ze zmienioną sekwencją, co skutkuje zmniejszonym wiązaniem do AP1 (Olferiev i wsp., 2007). Polimorfizmy w niekodującym regionie 3' mogą również zaburzać funkcję komórki, tak jak w przypadku tranzycji G→A w genie protrombiny, która prowadzi do obniżenia efektywności obróbki mRNA i zwiększenia nieprawidłowości w jego obrębie. SNP mogą wystąpić także w regionie kodującym. Jeżeli nie wywołują zmian sekwencji aminokwasów kodujących białka, są nazywane polimorfizmami synonimicznymi. Jeżeli następuje zmiana aminokwasu, polimorfizmy nazywa się niesynonimicznymi. Te z kolei dzielą się na missensowne (zmiany sensu),

które mogą prowadzić do upośledzenia funkcji białka, oraz nonsensowne, skutkujące przedwczesną terminacją transkrypcji. Tego typu polimorfizmy w rejonie granicznym między intronem a eksonem mogą prowadzić do alternatywnego składania (ang. *splicing*) i heterogenności produktów białkowych, co może odgrywać istotną rolę na przykład w rozwoju złośliwości nowotworów (Shupnik i wsp., 1998; Brinkman, 2004).

Między polimorfizmami genetycznymi może występować także nierównowaga sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*) powodująca nielosowe sprzężenia różnych *loci*, od czego zależą zmiany funkcji genu (Ogata i wsp., 2012).

Również w obrębie genów kodujących receptory estrogenowe opisywane są polimorfizmy pojedynczych nukleotydów. Sugeruje się, że związane z SNP potencjalne zaburzenia budowy receptorów estrogenowych, a co za tym idzie zaburzenia transdukcji sygnału estrogenowego, prowadzić mogą nie tylko do szeregu zaburzeń ogólnoustrojowych, ale także do upośledzenia męskiej płodności.

1.7. Polimorfizmy genów receptora estrogenowego 1 i 2 a podatność na choroby

Związek SNP receptorów estrogenowych z występowaniem schorzeń wydaje się być zależny od przynależności etnicznej. W bazie National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) znajduje się informacja o 8356 polimorfizmach *ESR1* i 2388 polimorfizmach *ESR2* (stan na 31.12.2013 roku); większość z nich zlokalizowana jest w intronach. Polimorfizmy *ESR1* rs2504063 i rs851982 związane są z obniżoną gęstością mineralną kości i zwiększonym ryzykiem osteoporozy (Styrkarsdottir i wsp., 2008). Wykazano związek dwudziestu trzech polimorfizmów *ESR1* ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2, powikłanej niewydolnością nerek, zaś warianty rs2234693 i rs9340799 mogą warunkować wystąpienie łagodnej depresji u kobiet (Keene i wsp., 2008; Ryan i wsp., 2012). Tranzycja T→C w polimorfizmach rs2077647 i rs2234693 zwiększa ryzyko marskości wątroby u pacjentów z zapaleniem wątroby typu B (Yan i wsp., 2011). Ponadto badania w populacji chińskiej wykazały związek polimorfizmu *ESR1* rs2234693 z występowaniem skoliozy idiopatycznej u kobiet, jednak polskie badania nie potwierdziły tej zależności dla populacji kaukaskiej (Janusz i wsp., 2013).

W przypadku *ESR2*, stwierdzono zależność między występowaniem zaburzeń miesiączkowania u kobiet populacji chińskiej dla polimorfizmów rs1256049 oraz

rs4986938 (Sundarajan i wsp., 2001). SNP rs4986938 wiązano także z zaawansowaną endometriozą w populacji japońskiej, choć w populacji greckiej, włoskiej i koreańskiej nie potwierdzono tej relacji. Nie potwierdzono również związku polimorfizmów *ESR2* z gęstością mineralną kości. Ponadto SNP rs4986938 występuje częściej u chorych z chorobą wieńcową niż u zdrowych pacjentów (Mansur Ade i wsp., 2005; Nott i wsp., 2008).

Jakkolwiek związek receptorów estrogenowych z patogenezą raka piersi jest dobrze udokumentowany, to jednak duże badania populacyjne nie potwierdziły jak dotąd jednoznacznie związku polimorfizmów *ESR2* z częstością występowania tego nowotworu. Związek ten podejrzewać można jedynie w wyniku analizy haplotypów (Hevir i wsp., 2011; Yu i wsp., 2011).

Podejmowano już próby analizy związku polimorfizmów genów kodujących receptory estrogenowe w kontekście płodności męskiej. Najczęściej opisywanymi SNP są: dla *ESR1* polimorfizmy w miejscach restrykcyjnych *PvuII* (397T→C) (rs2234693) i *XbaI* (351A→G) (rs934099) zlokalizowane w intronie 1 oraz dla *ESR2* *RsaI* (1082G→A) (rs1256049) w eksonie 5 i *AluI* (1730A→G) (rs4986938) w sekwencji niekodującej przy końcu 3' w eksonie 8. Polimorfizmy genetyczne mogą wpływać na strukturę kodowanych przez nie receptorów. Z uwagi na udowodniony udział estrogenów w funkcjonowaniu męskiego układu rozrodczego i rozpowszechnienie receptorów estrogenowych w jego obrębie, wydaje się, że zaburzenia transdukcji sygnału estrogenowego mogące powstawać w wyniku nieprawidłowej struktury receptora mogą mieć istotny wpływ na parametry nasienia i jego funkcję. Jednak wyniki dotychczasowych analiz badających związek polimorfizmów genów receptorów estrogenowych z płodnością męską są niejednoznaczne.

Dowiedziano związek niektórych polimorfizmów genów kodujących *ESR* z występowaniem chorób, jednak dane dotyczące ich relacji z patofizjologią niepłodności męskiej są jak dotąd niekompletne. Wydaje się, że wyjaśnienie roli polimorfizmów genów kodujących *ESR* w funkcjonowaniu gamety męskiej i procesie zapłodnienia pozwoliłoby przybliżyć zrozumienie molekularnego podłoża tych zjawisk. Szersze badania nad relacją wariantów *ESR* z koncentracją, ruchliwością, morfologią i żywotnością plemników mogą zaś w pewnym stopniu naświetlić przyczyny ich nieprawidłowych wartości. Ponadto, wraz z rozpowszechnieniem leczenia niepłodności metodami wspomaganego rozrodu, a w szczególności ICSI, istnieje ryzyko ominięcia naturalnego procesu eliminacji uszkodzonych komórek jakim jest apoptoza plemników.

Wiąże się to z możliwością nieprawidłowego rozwoju zarodka w przypadku zapłodnienia komórki jajowej plemnikiem apoptotycznym, z potencjalnie uszkodzonym DNA. Dlatego istotne jest poszerzenie wiedzy dotyczącej związku apoptozy gamet męskich z ich parametrami seminologicznymi oraz ze zdolnością zapładniającą.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

2.1. Założenia pracy

Pojawia się coraz więcej doniesień naukowych potwierdzających rolę estrogenów w biologii męskiego układu rozrodczego. Sugeruje się, że nieprawidłowo przekazywany sygnał estrogenowy może upośledzać funkcję gamety męskiej i zwiększać ryzyko niepłodności. Przyjmuje się, że konsekwencją polimorfizmów genów kodujących receptory estrogenowe jest zaburzona ekspresja lub struktura receptorów, co wpływa na obniżenie wartości biologicznej nasienia i funkcji zapładniającej plemnika. Może to również prowadzić do wzrostu odsetka gamet męskich z wykładnikami apoptozy. W dostępnym piśmiennictwie znaleźć można prace oceniające związek występowania w nasieniu plemników z wykładnikami apoptozy ze zdolnością zapładniającą gamet męskich, jednak jak dotąd nie ukazały się wyniki prezentujące te zależności na modelu ludzkich oocytów.

Wzrastający udział czynnika męskiego niepłodności i rosnące w związku z tym wykorzystanie metod wspomaganego rozrodu jako metody leczenia tego schorzenia stawia przed badaczami nowe wyzwania. Równocześnie rozwój technik wspomaganego rozrodu pozwala tak dokładnie jak nigdy wcześniej prześledzić proces zapłodnienia. Poznanie molekularnego podłoża upośledzonej funkcji gamet męskich może pozwolić na optymalizację wyników leczenia niepłodności. Obserwacja związku wykładników apoptozy z funkcją zapładniającą plemnika wydaje się więc istotnym elementem patofizjologii nasienia i procesu zapłodnienia.

2.2. Cel pracy

Celem pracy jest zbadanie związku wybranych polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2 oraz wykładników apoptozy plemników z funkcją zapładniającą gamety męskiej.

Szczegółowe cele pracy:

1. Ocena związku wybranych polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2 z parametrami nasienia w standardowej ocenie seminologicznej.
2. Analiza związku wybranych polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2 z wykładnikami apoptozy gamet męskich.
3. Zbadanie relacji wybranych polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2 ze skutecznością zapłodnienia pozaustrojowego metodą klasyczną i mikroiniekcyjną.
4. Analiza związku wykładników apoptozy plemników ze skutecznością zapłodnienia pozaustrojowego metodą klasyczną i mikroiniekcyjną.

3. MATERIAŁ

3.1. Charakterystyka grupy badanej

Grupę badaną stanowiło 123 niespokrewnionych ze sobą mężczyzn rasy kaukaskiej leczonych wraz z partnerkami z powodu niepłodności małżeńskiej w Ośrodku Diagnostyki i Leczenia Niepłodności przy Klinice Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w czasie od stycznia 2011 do listopada 2012. Badane pary zostały poddane procedurze zapłodnienia pozaustrojowego. Wszystkie pacjentki poddano stymulacji jajczkowania według protokołu długiego stymulacji (Depa-Martynow i wsp., 2007).

Kryteria wykluczenia z udziału w badaniu po stronie partnerki stanowiły:

- wiek powyżej 39 lat,
- FSH w 3-5 dniu cyklu > 12 mIU/ml,
- endometrioza III i IV stopnia według klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu (ASRM, ang. *American Society of Reproductive Medicine*) (ASRM 2012),
- zespół policystycznych jajników (PCOS).

Kryteria wykluczenia z udziału w badaniu po stronie partnera stanowiły:

- hipogonadyzm hipogonadotropowy,
- azoospermia.

Wszyscy pacjenci biorący udział w badaniu zostali poinformowani o jego celu oraz wyrazili zgodę na wykorzystanie materiału do celów badawczych. Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (numery uchwał: 425/11, 766/13 oraz 855/13).

3.2. Badanie nasienia

Pacjenci oddawali nasienie po 2-5-dniowej abstynencji płciowej. Ejakulat badano dwuetapowo. Najpierw, przed przeprowadzaną w dniu pobrania oocytów procedurą zapłodnienia pozaustrojowego, wykonywano standardową ocenę seminologiczną. Następnie tego samego dnia badano pozostałość próbki po przeprowadzonej procedurze zapłodnienia pozaustrojowego w celu określenia wykładników apoptozy gamet, a więc obecności błonowej translokacji fosfatydyloseryny oraz aktywnej formy kaspazy-3. Analizę tę rozpoczynano nie później niż 90 minut po procedurze zapłodnienia *in vitro*. Do tego czasu próbki przechowywane były w temperaturze 37°C.

Na badanie wykładników apoptozy plemników wyraziło zgodę 91 pacjentów. Badaniom na obecność błonowej translokacji fosfatydyloseryny poddano wszystkie 91 próbek nasienia. Badaniu aktywnej formy kaspazy-3 poddano nasienie 74 pacjentów. Pozostałe 17 próbek wykluczono z analiz ze względu na zbyt małą objętość.

Ocenę wykładników apoptozy plemników prowadzono w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.3. Procedura zapłodnienia pozaustrojowego

Procedurę zapłodnienia pozaustrojowego prowadzono u wszystkich par w sposób standardowy obowiązujący w Ośrodku Diagnostyki i Leczenia Niepłodności przy Klinice Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, obejmujący oprócz początkowego etapu zapłodnienia komórki jajowej także hodowlę i obserwację zarodków, a następnie transfer zarodków do jamy macicy pacjentki (Depa-Martynow i wsp., 2007).

Do badania kwalifikowano jedynie pary, u których w wyniku punkcji jajników uzyskano co najmniej dwa dojrzałe oocyty w stadium metafazy II podziału redukcyjnego (MII). W związku z tym ostatecznie wyniki analizowano dla 116 par. Za wskaźnik skuteczności zapłodnienia przyjęto odsetek komórek jajowych, w których 16 do 18 godzin po procedurze zapłodnienia stwierdzono obecność dwóch przedjądrzy. Ze względu na zastosowaną metodę zapłodnienia pozaustrojowego populację badaną podzielono na potrzeby tej pracy na dwie grupy: grupę A, składającą się z 40 par,

u których wykonano IVF oraz grupę B, składającą się z 76 par, u których wykonano ICSI.

Pobranie od pacjentek komórek jajowych, ocenę seminologiczną oraz procedurę zapłodnienia pozaustrojowego prowadzono w Ośrodku Diagnostyki i Leczenia Niepłodności przy Klinice Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.4. Analiza polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2

Celem analizy genetycznej było określenie częstości występowania w grupie badanych mężczyzn polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genu receptora estrogenowego 1 rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne: *PvuII* (rs2234693) i *XbaI* (rs9340799). Określono również SNP genu receptora estrogenowego 2 rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne: *AluI* (rs4986938), *RsaI* (rs1256049) oraz *AlwNI* (rs1256120).

Od badanych mężczyzn pobierano 5 ml krwi obwodowej ze zgięcia łokciowego do jałowych probówek S-monovette (SARSTEDT AG & Co., Numbrecht, Niemcy) zawierających EDTA jako antykoagulant. Krew tę wykorzystano do badań SNP genów *ESR1* i *ESR2*.

Do izolacji DNA wykorzystano krew pobraną od 116 pacjentów, którą do momentu prowadzenia analiz genetycznych przechowywano w temperaturze -20 °C.

Badania genetyczne związane z analizą polimorfizmów genów *ESR1* i *ESR2* prowadzono w Katedrze i Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

4. METODY

4.1. Ocena podstawowych parametrów seminologicznych nasienia

Analiza podstawowych parametrów nasienia prowadzona była według procedur zalecanych przez WHO w rekomendacjach z 2010 roku (WHO, 2010). Każda próbka nasienia badana była po 2-5-dniowym okresie wstrzemięźliwości seksualnej. Próbkę poddawano 30-60-minutowemu upłynnieniu w temperaturze 37°C i analizowano ich objętość, ciągłość, aglutynację i pH. Przyżyciową ocenę gamet wykonywano w mikroskopie fazowo-kontrastowym (Olympus CH 30) przy powiększeniu 400 x.

Koncentracja plemników, wyrażana w milionach komórek na mililitr ejakulatu, badana była przy użyciu ulepszanego hemocytometru Neubauera. Pomiaru koncentracji dokonywano dwukrotnie i oceniano różnicę między pomiarami, którą odnoszono do przyjętej według WHO możliwej granicy błędu (WHO, 2010).

Ruchliwość gamet oceniano po upłynnieniu. Zliczano każdorazowo 200 gamet przez ocenę pięciu pól widzenia przy powiększeniu 400 x. Stosowano podział na następujące kategorie ruchu:

- ruch postępowy (gamety poruszające się aktywnie, liniowo lub po dużym okręgu, bez względu na szybkość ruchu)
- ruch niepostępowy (wszystkie pozostałe typy ruchu nie powodujące przemieszczania gamet, na przykład pływanie po małym okręgu, gwałtowne wychylenia główki powodowane silnymi ruchami witki, ruch jedynie w obrębie witki)
- brak ruchu.

Badanie ruchliwości prowadzono dwukrotnie dla każdej próbki. Wynik ostateczny stanowiła średnia ruchliwość z dwóch analiz dla poszczególnych rodzajów ruchu z dokładnością do 1% gamet.

Morfologia plemników oceniana była w nasieniu, z którego na oczyszczonych 70% alkoholem szkiełkach przygotowywano dla próbek pochodzących od

poszczególnych pacjentów po dwa cienkie rozmazy dające możliwość badania do 10 plemników w polu widzenia. Rozmazy pozostawiano do wyschnięcia i utrwalano w 95% etanolu, a następnie barwiono zmodyfikowaną metodą Papnicolaou. Budowę komórek analizowano w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 1000 x z zastosowaniem olejku immersyjnego, oglądając każdorazowo po 200 komórek i zapisując procent plemników o prawidłowej morfologii. Wynik ostateczny stanowiła średnia z dwóch pomiarów. Za prawidłowe uznano plemniki o następujących cechach:

1. Główka o gładkim obrysie, kształtu owalnego. Region akrosomalny stanowiący 40-70% główki, nie zawierający dużych wakuol i mający nie więcej niż dwie małe wakuole, nie zajmujące więcej niż 20% główki. Region post-akrosomalny nie zawierający żadnych wakuol.
2. Wstawka symetryczna, długością odpowiadająca długości główki. Oś wstawki zgodna z osią główki. Cytoplazma wstawki o objętości nie przekraczającej 1/3 rozmiaru główki.
3. Witka o jednorodnej średnicy na całej długości, cieńsza niż wstawka, długości około 45 μm (około dziesięciokrotna długość główki), może być zawinięta na siebie, bez śladów złamania.

4.1.1. Ocena żywotności plemników - test hipoosmotyczny

Badanie prowadzono według metody zaproponowanej przez Jeyendran i wsp. i zalecanej przez Światową Organizację Zdrowia (Jeyendran i wsp., 1984; WHO, 2010). Gamety inkubowano w 1 ml medium HOS Test (FertiPro, Belgia). Po 30 minutach wykonywano rozmaz i oceniano 200 plemników w mikroskopie fazowo-kontrastowym przy powiększeniu 400 x, a następnie zliczano odsetek plemników z zawiniętą wtką. Analizę przeprowadzano dwukrotnie, wynik ostateczny stanowiła średnia pomiarów. Test hipoosmotyczny przyjęto jako kryterium żywotności gamet.

4.2. Procedura zapłodnienia pozaustrojowego

4.2.1. Stymulacja jajczkowania

Wszystkie pacjentki poddano kontrolowanej stymulacji jajczkowania aby uzyskać odpowiednią ilość komórek jajowych. Stosowano tak zwany „długi protokół stymulacji z agonistą GnRH”, oparty o desensybilizację przysadki mózgowej poprzez

supresję LH w wyniku codziennego podawania od 21. dnia cyklu miesięczkowego analogu GnRH (0,1 mg/dzień Triptorelin, Gonapeptyl Daily, Ferring). Za kryteria desyngbilizacji przyjęto: wykluczenie obecności w gonadach pęcherzyków o średnicy przekraczającej 5 mm i potwierdzenie grubości endometrium < 4 mm przy użyciu ultrasonografii przezpochwowej (TVS, ang. *trans-vaginal sonography*) (ultrasonograf Aloka 6α firmy Aloka), oraz poziom 17β -estradiolu w osoczu < 40 pg/ml. Następnie stymulowano jajniki przy pomocy codziennych podskórnych iniekcji gonadotropiny rekombinowanej (150-225 IU, Gonal F, Serrano). Dawki gonadotropiny modyfikowane były indywidualnie, w zależności od odpowiedzi pacjentki na zastosowane leki. Odpowiedź tę kontrolowano przy pomocy TVS oraz stężenia estradiolu w surowicy krwi. W dniu uzyskania przez pęcherzyki dominujące średnicy co najmniej 18 mm oraz stężenia estradiolu 150-200 pg/ml na każdy z pęcherzyków dominujących, podawano domięśniowo 10 000 jednostek ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (HCG) (Pregnyl, Organon). Po 36 godzinach od aplikacji HCG, w krótkim znieczuleniu dożylnym nakłuwano pęcherzyki przez sklepienia pochwy pod kontrolą TVS. Aspirowano płyn pęcherzykowy w celu uzyskania komórek jajowych (Depa-Martynow i wsp., 2007).

4.2.2. Ocena komórek jajowych

W mikroskopie odwróconym (Olympus JX 70) dokonywano wstępnej kwalifikacji komórek jajowych. Do procedury IVF kwalifikowano jedynie dojrzałe komórki jajowe w stadium metafazy II podziału meiotycznego (MII) (Depa-Martynow i wsp., 2007).

4.2.3. Przygotowanie nasienia do procedury zapłodnienia pozaustrojowego

Ejakulat, poddany najpierw upłynnieniu, selekcjonowano na gradiencie SpermGrad (Vitrolife, Szwecja) według zaleceń producenta. Metoda ta obejmuje utworzenie w jałowych probówkach trzech warstw składających się kolejno z: 1) 1,5 ml 90% buforu SpermGrad, 2) 1,5 ml 40% buforu SpermGrad oraz 3) nasienia (1,5 ml) na szczycie. Próbkę wirowano (18 minut, 350 g), a następnie zbierano osad zawierający plemniki i zawieszano go w medium G-IVF Plus (Vitrolife, Szwecja). Mieszaninę wirowano dwukrotnie (10 minut, 300 g) i zawieszano ponownie w medium G-IVF Plus. Plemniki przed wykorzystaniem do procedury IVF poddawano przez dwie godziny kapacytacji w inkubatorze (temperatura 37°C, stężenie CO₂ 5%).

4.2.4. Zapłodnienie pozaustrojowe metodą klasyczną

Komórki jajowe umieszczano na płytkach pięciokomorowych. Do każdej płytki dodawano po około 50 000 – 100 000 przygotowanych uprzednio plemników na oocyt i umieszczano w inkubatorze (maksymalna wilgotność, temperatura 37°C, stężenie CO₂ 6%).

4.2.5. Zapłodnienie pozaustrojowe metodą mikroiniekcyjną

Na płytki do ICSI nakładano bufor MOPS Plus (Vitrolife, Szwecja) oraz nasienie. Płytki pokrywano warstwą oleju parafinowego OVOIL (Vitrolife, Szwecja). Następnie na przygotowanych płytkach umieszczano pojedynczo wyselekcjonowane komórki jajowe w stadium MII. Wybrane plemniki o prawidłowej morfologii i ruchliwości były unieruchamiane poprzez złamanie witki (immobilizacja plemnika). Iniekcja pojedynczego plemnika przy pomocy igły mikroiniekcyjnej polegała na przebicium najpierw osłonki przejrzystej, a następnie oolemy i umieszczeniu plemnika w cytoplazmie komórki jajowej. Po zakończeniu procedury komórki zawieszano w medium G-1 Plus (Vitrolife, Szwecja), pokrywano olejem parafinowym OVOIL (Vitrolife, Szwecja) i umieszczano w inkubatorze (maksymalna wilgotność, temperatura 37°C, stężenie CO₂ 6%).

4.2.6. Ocena skuteczności zapłodnienia pozaustrojowego

Po 16-18 godzinach od wykonania procedury IVF oceniano skuteczność zapłodnienia. Jako wykładnik skutecznego zapłodnienia przyjęto obecność w komórce jajowej dwóch przedjądrzy.

4.3. Badanie wykładników apoptozy plemników

4.3.1. Oznaczanie błonowej translokacji fosfatydyloseryny

Aneksyna-V (AnV) znakowana fluoresceiną (AnV-FITC) (Molecular Diagnostics, Niemcy) posłużyła do oznaczania błonowej translokacji fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej gamet. Barwienie przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. W środowisku zawierającym jony wapniowe AnV wiąże wybiórczo fosfatydyloserynę na zewnętrznym listku błony. Dla wyróżnienia grupy plemników martwych stosowano barwienie jodkiem

propidionowym (PI) w końcowym stężeniu 0,125 µg/l (Sigma-Aldrich, USA). Barwnik ten wnika do wnętrza komórek mających uszkodzoną błonę komórkową i dociera do jądra komórkowego, gdzie wiąże DNA i RNA, co skutkuje czerwono-różową fluorescencją.

Plemniki przygotowane jak w rozdziale 4.2.3. inkubowano z AnV-FITC i PI w ciemności, w temperaturze pokojowej, przez 15 minut.

Do analizy topohistochemicznej błonowej translokacji fosfatydyloseryny zastosowano mikroskop konfokalny LSM 510 z wykorzystaniem obiektywu Plan APOCHROMAT 63x/1.4 Oil DIC (Zeiss, Niemcy). Aneksynę-V znakowaną fluoresceiną wzbudzano przy pomocy światła laserowego o długości 488 nm, kanał emisyjny 505-530 nm. Do wzbudzenia jodku propidionowego wykorzystano światło o długości 543 nm, kanał emisyjny >585 nm. Analizę ilościową plemników z błonową translokacją fosfatydyloseryny z uwzględnieniem ich żywotności oznaczano w cytometrze przepływowym po zawieszeniu ich w 300 µl medium inkubacyjnym o składzie (10 mmol/l HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mmol/l NaCl and 5 mmol/l CaCl₂) (Kotwicka i wsp., 2011a). Zasady badania w cytometrze przepływowym opisano w rozdziale 4.3.3.

4.3.2. Wykrywanie plemników z aktywną formą kaspazy-3

Do wykrywania komórek z aktywną formą kaspazy-3 posłużył inhibitor tej kaspazy DEVD-FMK skoniugowany z fluoresceiną (FITC-DEVD-FMK) (Calbiochem, Niemcy). Procedurę przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Plemniki przygotowane jak w rozdziale 4.3.3. poddano inkubacji z FITC-DEVD-FMK przez 45 minut w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Po 35 minutach inkubacji dodawano 1 µl PI [0,125 µg/ml] i inkubowano przez dalsze 10 minut w celu wykrycia komórek martwych.

Zawieszenie gamet w 100 µl buforu producenta umożliwiło analizy mikroskopowe, które prowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego z filtrami jak w rozdziale 4.3.1. W celu badania ilościowego w cytometrze przepływowym zawieszano komórki w 300 µl buforu producenta. (Kotwicka i wsp., 2008). Zasady pomiaru w cytometrze przepływowym opisano w rozdziale 4.3.3.

4.3.3. Technika pomiarów w cytometrze przepływowym

Cytometr przepływowy FACS Calibur (Becton-Dickinson, USA) służył do rejestrowania sygnałów fluorescencyjnych plemników znakowanych odpowiednimi fluorochromami. Populację komórek bramkowano dzięki sygnałom rozproszonym pod małym kątem (FSC – ang. *forward scatter*), umożliwiającym ocenę wielkości komórki oraz sygnałom rozproszonym pod dużym kątem (SSC – ang. *side scatter*), umożliwiającym ocenę ziarnistości cytoplazmy. W każdym doświadczeniu badano 10000 komórek.

AnV-FITC oraz FITC-DEVD-FMK wzbudzano światłem lasera argonowego o długości 488 nm, indukując zieloną fluorescencję aktywnej kaspazy-3 oraz aneksyny-V, rejestrowaną w pierwszym kanale fluorescencyjnym (FL1) przez detektor światła o zakresie 515-545 nm. Światło lasera argonowego o tej samej długości indukowało czerwono-różową fluorescencję jodku propidionowego, rejestrowaną w trzecim kanale fluorescencyjnym (FL3) o zakresie > 650 nm. Wszystkie dane uzyskiwane w analizie zbierano i analizowano przy pomocy programu komputerowego CellQuest Pro wersja 5.2.1 (Becton-Dickinson, USA).

4.4. Analiza genetyczna

Aby określić występowanie w badanej populacji mężczyzn polimorfizmów genów receptorów estrogenowych, prowadzono w pierwszym etapie izolację całkowitego genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej. Następnie powielano DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – ang. *polymerase chain reaction*). Produkty PCR oceniano przy użyciu elektroforezy porównując ze wzorcem wielkości. Polimorfizmy badanych genów oznaczano przy pomocy techniki PCR połączonej z analizą restrykcyjną (PCR-RFLP - ang. *restriction fragments length polymorphism*). Losowe próby sekwencjonowano celem potwierdzenia prawidłowości produktów względem sekwencji zdeponowanych w bazie NCBI.

4.4.1. Izolacja genomowego DNA z pełnej krwi obwodowej

Do izolacji całkowitego genomowego DNA z krwi obwodowej pacjentów wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw Axy Prep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, Inc., Union City, CA, USA). Izolację prowadzono

w temperaturze pokojowej według zaleceń producenta zestawu w następującej kolejności:

1. Do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml dodawano 500 μ l buforu AP1. Do każdej probówki dodawano po 250 μ l krwi i wytrząsano intensywnie na mieszadle aby uwolnić genomowe DNA, a następnie dodawano po 100 μ l buforu AP2 i ponownie wytrząsano. Prawidłowo przeprowadzona liza erytrocytów prowadziła do zmiany koloru mieszaniny na brunatny.
2. Probówki z zawiesiną po lizie umieszczano w wirówce laboratoryjnej i wirowano przez 10 minut z przyspieszeniem 12000 g w temperaturze pokojowej. Supernatant nanoszono na kolumnę do izolacji DNA umieszczoną w probówce zbiorczej, a następnie odwirowywano (1 minuta, 12000 g, temperatura pokojowa). Przesącz usuwano, a filtr przemywano 700 μ l buforu W1A. Mieszaninę inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano (1 minuta, 12000 g, temperatura pokojowa). Po usunięciu przesączu dodawano 800 μ l buforu W2 i wirowano przy tych samych parametrach. Kolumny ze złożem umieszczano w nowych probówkach zbiorczych o objętości 1,5 ml.
3. Na kolumny nanoszono 80 μ l wody podgrzanej do temperatury 65°C i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 minutę, a następnie wirowano (1 minuta, 12000 g, temperatura pokojowa). W przesączu uzyskiwano całkowity genomowy DNA, który wykorzystywano bezpośrednio do dalszych badań.

4.4.2. PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy

Wyizolowane DNA wykorzystano w łańcuchowej reakcji polimerazy w celu amplifikacji fragmentów genu *ESR1* i *ESR2*. Wykorzystywano 25 μ l mieszaniny zawierającej 200 ng genomowego DNA, 300 nmol/l każdego z genomowo specyficznych starterów oraz 1 x KAPA HiFi HotStart Ready Mix (KAPABiosystems). Reakcję PCR przeprowadzano stosując odpowiednie warunki termiczne hybrydyzacji w termocyklerze BIO-Rad mini Thermal Cycler. W tabeli 4.1. zawarto zestawienie genomowo specyficznych starterów przednich (F; ang. *forward*) i wstecznych (R; ang. *reverse*) użytych w reakcji PCR dla genu *ESR1*. W tabeli 4.2. przedstawiono startery wykorzystane w reakcji PCR dla genu *ESR2*. Przy pomocy sekwencji pochodzących z bazy NCBI Gene SNP oraz algorytmowi komputerowemu firmy Genomatix

(www.genomatix.de) zlokalizowano polimorfizmy i zaprojektowano sekwencje starterów w regionach 5' i 3' oskrzydlających dane polimorfizmy, do czego użyto algorytmu programu Primer3Plus (Andreas Untergasser, Harm Nijveen, licencja GPL). Startery zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed SA, Warszawa, Polska. Temperaturę hybrydyzacji starterów dobrano empirycznie.

Warunki termiczne i liczbę cykli właściwą odpowiednio dla *ESR1* i *ESR2* zawarto odpowiednio w tabelach 4.3. i 4.4.

Tabela 4.1. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji PCR dla genu *ESR1*

Starter	Sekwencja 5' → 3'	Temperatura hybrydyzacji	Długość ampliconu
ESR1_rs9340799_XbaI_F	CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCT ATTCTCC	71°C	1300 pz
ESR1_rs9340799_XbaI_R	TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGAT TATCTGA		
ESR1_rs2234693_PvuII_F	AGGCTGGGCTCAAACACTACAG	60°C	759 pz
ESR1_rs2234693_PvuII_R	TCCTTGCCAGATTCATAGC		

F – genowo specyficzne startery przednie, R – genowo specyficzne startery wsteczne

Tabela 4.2. Zestawienie starterów wykorzystanych w reakcji PCR dla genu *ESR2*

Starter	Sekwencja 5' → 3'	Temperatura hybrydyzacji	Długość ampliconu
ESR2_rs4986938_Alul_F	GTGTGTGGTGGGACACAGAG	65°C	646 pz
ESR2_rs4986938_Alul_R	AGGCCATTGAGTGTGGAAAC		
ESR2_rs1256049_RsaI_F	TTCTGAGCCGAGGTCTAGT	66°C	582 pz
ESR2_rs1256049_RsaI_R	TGAATCCTTGGACCCAACTC		
ESR2_rs1256120_AlwNI_F	GACTTTGTACACACCTGCG	68°C	620 pz
ESR2_rs1256120_AlwNI_R	AAACAGGCCACCGTCAGAAA		

F – genowo specyficzne startery przednie, R – genowo specyficzne startery wsteczne

Tabela 4.3. Warunki termiczne dla reakcji PCR w obrębie genu *ESR1*

Miejsce restrykcyjne	<i>XbaI</i>		<i>PvuII</i>	
	Temperatura, czas	Cykle	Temperatura, czas	Cykle
Wstępna denaturacja	95°C, 5 min	1	95°C, 5 min	1
Denaturacja	95°C, 20 s	30	95°C, 30 s	40
Przylączenie	71°C, 15 s		60°C, 30 s	
Wydłużanie	72°C, 15 s		70°C, 1.20 s	
Końcowe wydłużanie	72°C, 3 min	1	70°C, 5 min	1

Tabela 4.4. Warunki termiczne dla reakcji PCR w obrębie genu *ESR2*

Miejsce restrykcyjne	<i>AluI</i>		<i>RsaI</i>		<i>AlwNI</i>	
	Temperatura, czas	Cykle	Temperatura, czas	Cykle	Temperatura, czas	Cykle
Wstępna denaturacja	95°C, 5 min	1	95°C, 5 min	1	95°C, 5 min	1
Denaturacja	98°C, 20 s	30	98°C, 20 s	30	98°C, 20 s	30
Przyłączanie	65°C, 15 s		66°C, 15 s		68°C, 15 s	
Wydłużanie	72°C, 15 s		72°C, 15 s		72°C, 15 s	
Ostateczne wydłużanie	72°C, 1 min	1	72°C, 1 min	1	72°C, 1 min	1

4.4.3. Elektroforetyczna analiza produktu PCR

W celu porównania wielkości produktów PCR ze wzorcem (Nova 100, Novazym) rozdzielano 5 µl mieszaniny w 2% żelu agarozowym (FMC BioProducts, Rockland, USA) w buforze 1xTBE (Tris [89 mmol/l], kwas borowy H₃BO₃ [89 mmol/l] oraz EDTA [2 mmol/l]) w obecności bromku etydyny (500 ng/ml). Po identyfikacji prawidłowego produktu, pozostałą część mieszaniny oczyszczano przy pomocy zestawu AxyPrep PCR Clean-up Kit zgodnie z procedurą zaleconą przez producenta. Procedurę prowadzono w temperaturze pokojowej, a jej poszczególne etapy przedstawiono poniżej:

1. 100 µl buforu PCR-A dodano do 20 µl mieszaniny PCR;
2. w probówce zbiorczej o objętości 2 ml umieszczono kolumnę AxyPrep;
3. mieszaninę PCR-A i PCR naniesiono na kolumnę i wirowano przez 1 minutę (12000 g);
4. usunięto przesącz, kolumnę przemyto 700 µl buforu W2 i zwirowano (12 000 g, 1 minutę);
5. usunięto przesącz, kolumnę przemyto ponownie 400 µl buforu W2 i zwirowano (12 000 g, 1 minutę);
6. usunięto przesącz, kolumnę umieszczono w nowej próbówce zbiorczej (1,5 ml);
7. dodano 30 µl podgrzanej do 65 °C wody dejonizowanej;
8. inkubowano przez 1 minutę w temperaturze pokojowej, następnie zwirowano (12 000 g, 1 minutę); Uzyskane w ten sposób oczyszczone DNA poddano

analizie restrykcyjnej. Dodatkowo losowo uzyskane próby przesyłano w celu potwierdzenia ich identyczności z wzorcami zdeponowanymi w bazie NCBI.

4.4.4. Enzymy restrykcyjne wykorzystane do oceny SNP genów *ESR1* i *ESR2*

W celu wyselekcjonowania enzymów restrykcyjnych dla wybranych sekwencji SNP użyto programu NEBcutter V2.0 firmy New England BioLabs Inc. (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Zastosowano enzymy FastDigest Enzyme firmy Thermo Scientific, Waltham, MA, USA. Dokładny opis miejsc restrykcyjnych oraz długości otrzymanych fragmentów w zależności od obecnego allelu dla genów kodujących oba receptory zawarte zostały w tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Zastosowane enzymy restrykcyjne z uwzględnieniem miejsca restrykcyjnego oraz długości otrzymanych fragmentów dla *ESR1* i *ESR2*

Enzym restrykcyjny	Miejsce restrykcyjne		Allele	Długość fragmentów restrykcyjnych
ESR1_rs9340799_XbaI	T*CTAGA	T*CT <u>A</u> GA	A	910 pz + 390 pz
		TCT <u>G</u> GA	G	1300 pz
ESR1_rs2234693_PuvII	CAG*CTG	CAG* <u>C</u> TG	T	271 pz + 488 pz
		CAG <u>C</u> CG	C	759 pz
ESR2_rs4986938_AluI	AG*CT	<u>A</u> G*CT	A	445 pz + 201 pz
		<u>G</u> GCT	G	646 pz
ESR2_rs1256049_RsaI	GT*AC	GT* <u>A</u> C	A	293 pz + 289 pz
		GT <u>G</u> C	G	582 pz
ESR2_rs1256120_AlwNI	CAGNNN*CTG	CAGNNN* <u>C</u> TG	C	158 pz + 462pz
		CAGNNN <u>T</u> TG	T	620pz

4.4.5. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych

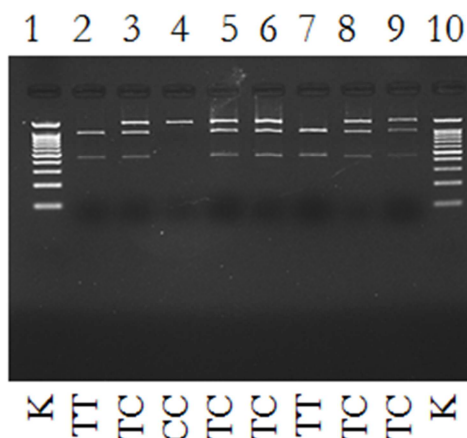
Uzyskane przy użyciu PCR specyficzne fragmenty hydrolizowano enzymami restrykcyjnymi właściwymi dla badanych polimorfizmów genów *ESR1* i *ESR2*. Wyniki uzyskane dzięki PCR-RFLP analizowano przy zastosowaniu elektroforezy w żelu agarozowym w buforze 1xTBE w obecności bromku etydyny. Do 2 µl DNA otrzymanego w reakcjach PCR dodawano 1 FDU enzymu, 0,7 µl buforu FastDigest Green (zawierającego obciążnik) i dopełniano do 10 µl wodą wolną od RNaz, DNaz i pirogenów. Następnie mieszaninę poddawano dwugodzinnej inkubacji w termocyklerze w temperaturze 37°C i dziesięciominutowej denaturacji enzymu w temperaturze 85°C. Po schłodzeniu całość mieszaniny uzyskanej po hydrolizie enzymami restrykcyjnymi analizowano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym przy napięciu 70 V. Uzyskane prążki obrazowano z zastosowaniem systemu analizy obrazu

G:Box (Syngen Biotech). Pozwoliło to na zaobserwowanie polimorfizmów miejsc restrykcyjnych poprzez obserwację na żelu jednego, dwóch lub trzech prążków, które porównywano ze wzorcem wielkości (Nova 100).

Zdjęcia żeli zostały odczytane przez jedną osobę. Wyniki zostały opisane w postaci genotypów w zależności od obecności lub braku miejsca rozpoznawanego i ciętego enzymem restrykcyjnym i po otrzymaniu fragmentów odpowiedniej długości opisanych w tabeli 4.5. Dla poszczególnych enzymów w przypadku wystąpienia cięcia w obu niciach w elektroforezie otrzymywano dwa prążki odpowiadające dwóm krótszym fragmentom. Obraz taki był charakterystyczny dla homozygoty wywołującej reakcję restrykcji. Występowanie wyłącznie jednego prążka w elektroforezie o długości typowej dla całego, nieprzeciętego fragmentu było obrazem typowym dla homozygoty allelu niepowodującego reakcji restrykcyjnej. Wystąpienie w elektroforezie trzech prążków odpowiadających długością zarówno fragmentom przeciętym jak i fragmentowi nieprzeciętemu było charakterystyczne dla heterozygot (Rycina 4.1.)

Wyniki dla poszczególnych enzymów restrykcyjnych opisano następująco: dla *PvuII*: TT/TC/CC, dla *XbaI*: AA/AG/GG, dla *AluI*: AA/AG/GG, dla *RsaI*: GG/GA/AA, dla *AlwMI*: CC/CT/TT.

Na rycinie 4.1. znajduje się przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów PCR dla genu *ESR1* (rs2234693) po przeprowadzeniu analizy restrykcyjnej.



Rycina 4.1. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów PCR dla genu *ESR1*. Cięcie enzymem restrykcyjnym *PvuII*. Obecność dwóch prążków wskazuje na homozygotę TT, trzech prążków na heterozygotę TC, zaś jednego prążka na homozygotę CC. K – kontrola (marker wielkości Nova 100)

4.5. Analiza statystyczna

Normalność rozkładu w grupach badanych sprawdzano przy pomocy testu Kolmogorova-Smirnova. W przypadku stwierdzenia normalności rozkładu badanych cech porównywano je przy pomocy testu t Studenta dla dwóch grup. Grupy, w których nie stwierdzono zgodności rozkładu empirycznego z rozkładem normalnym dane porównywano przy pomocy testu U Manna-Whitneya dla dwóch grup oraz testu Kruskala-Wallisa dla większej liczby grup. Korelacje wykładników apoptozy i skuteczności zapłodnienia pozaustrojowego obliczano za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana.

Przy pomocy testu χ^2 obliczano zależności cech i genotypów miejsc restrykcyjnych dla tabel spełniających następujące warunki: żadna z licznosci oczekiwanych nie może być < 1 oraz nie więcej niż 20% licznosci oczekiwanych może być < 5 . W pozostałych przypadkach zastosowanie znalazł test dokładny Fishera w rozszerzeniu Freemana-Haltona. Te same testy wykorzystano do obliczenia zgodności rozkładu genotypów z prawem Hardy-Weinberga.

Do obliczeń statystycznych wykorzystano program Statistica 10, StatSoft, Tulsa, USA oraz program PQStat 1.4.8.224, PQStat Software, Polska.

Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

5. WYNIKI

5.1. Charakterystyka badanych pacjentów

Przeciętny wiek pacjentów w całej badanej populacji wyniósł 34 lata, a ich partnerki miały średnio 32 lata. Średni wiek mężczyzn i kobiet nie różnił się pomiędzy wyodrębnionymi grupami ($p > 0,05$ zarówno w grupie A jak i w grupie B). Do wszystkich procedur IVF u badanych par wykorzystano przeciętnie 6 oocytów w stadium MII, przy czym w grupie A do każdej procedury konwencjonalnego IVF wykorzystano przeciętnie 4 oocyty, zaś w grupie B, do procedur ICSI zastosowano średnio 7 dojrzałych komórek jajowych ($p < 0,05$). Obliczono także średnią liczbę zapłodnionych oocytów w obu grupach i stwierdzono, że zapłodnienie dokonało się w 67% komórek jajowych w grupie A i w 73% komórek jajowych w grupie B ($p > 0,05$). Parametry opisujące badaną populację w grupach zebrano w tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Charakterystyka badanej populacji z uwzględnieniem podziału na grupy w zależności od metody zapłodnienia pozaustrojowego

	A		B		p	A+B	
	Średnia ± SD	Mediana	Średnia ± SD	Mediana		Średnia ± SD	Mediana
Wiek kobiet	32±4	32	32±3	32	>0,05**	32±4	32
Wiek mężczyzn	34±5	34	34±4	34	>0,05**	34±5	34
Liczba oocytów	4±2	3	7±4	6	<0,05*	6±4	4
Odsetek zapłodnionych oocytów [%]	67±38	83	73±31	80	>0,05*	71±33	80

A – grupa pacjentów poddanych konwencjonalnemu IVF, B – grupa pacjentów poddanych ICSI; SD – odchylenie standardowe; *- test U Manna-Whitneya, **- test t Studenta

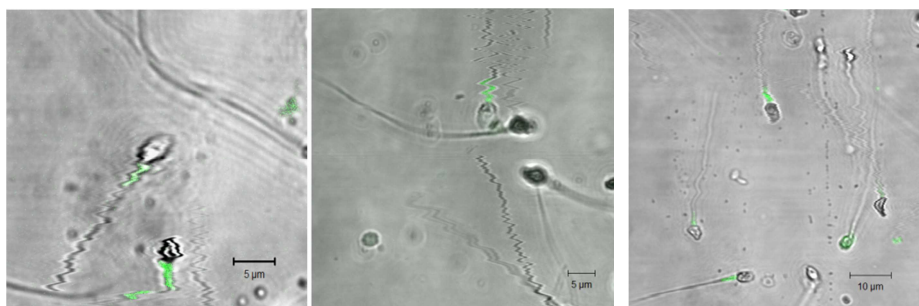
5.2. Analiza parametrów nasienia w grupie badanej

5.2.1. Podstawowe parametry nasienia

W całej badanej populacji średnia koncentracja plemników wyniosła 25 mln/ml, średnia ilość plemników poruszających się ruchem postępowym wyniosła 18%, średnia prawidłowa morfologia plemników wyniosła 4%, a średnia żywotność wyniosła 53%. W całej grupie badanej normozoospermie w zakresie koncentracji, ruchliwości i morfologii plemników zaobserwowano u 28 (24%) pacjentów.

5.2.2. Wykładniki apoptozy w plemnikach

Obserwacje mikroskopowe oraz analizy wykonane przy pomocy cytometrii przepływowej wykazały w badanych próbkach wykorzystanych do zapłodnienia pozaustrojowego obecność gamet z wykładnikami apoptozy. Zarówno błonowa PST jak i aktywna forma c3 widoczne były przede wszystkim w okolicy wstawki plemnika (Rycina 5.1. i 5.2.), a komórki z tymi wykładnikami apoptozy w większości wykazywały ruch progresywny.

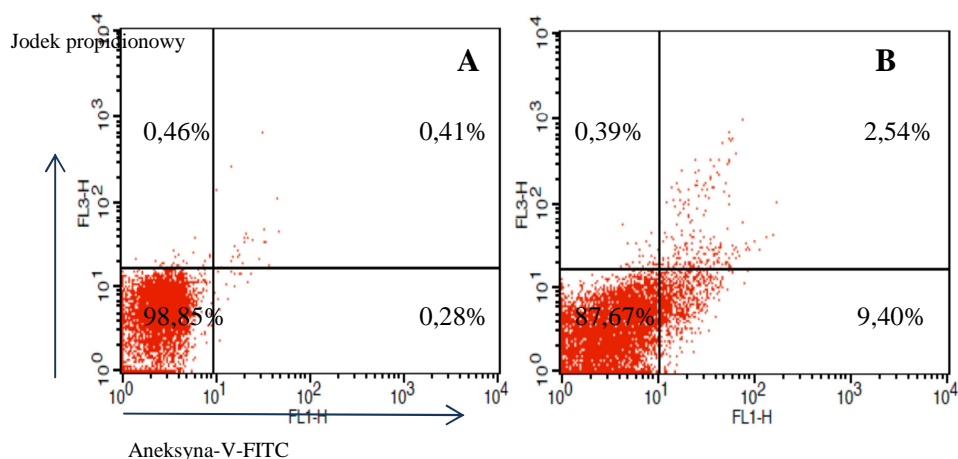


Rycina 5.1. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego z widoczną frakcją żywych, ruchliwych plemników z błonową translokacją fosfatydyloseryny w obrębie wstawki (barwienie aneksyną-V znakowaną fluorescencją, pow. obiektywu x63).

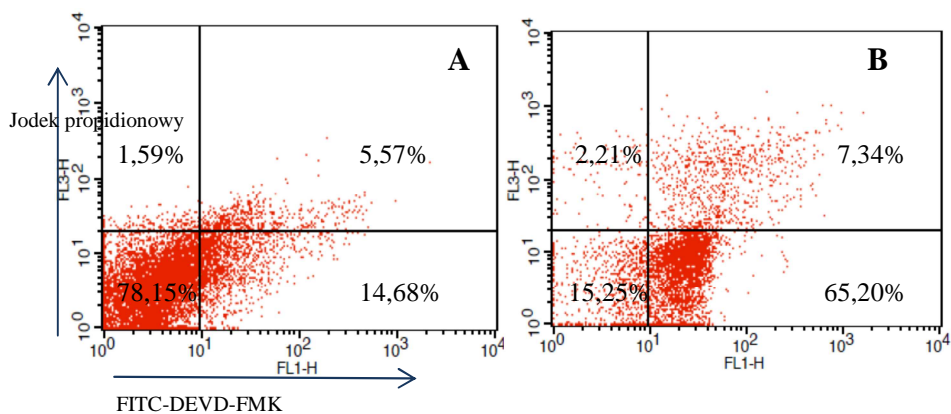


Rycina 5.2. Plemniki z pozytywnym odczynem na aktywną formę kaspazy-3. (zielona fluorescencja) w okolicy wstawki; większość plemników z aktywną formą kaspazy-3 wykazywała ruch progresywny (barwienie inhibitorem aktywnej formy kaspazy 3 znakowanym fluorescencją, pow. obiektywu x63).

W próbkach badanych przy pomocy cytometru przepływowego, zarówno przy ocenie PST jak i obecności aktywnej formy c3, wyodrębniono cztery frakcje komórek. W badaniu PST były to: plemniki martwe bez PST, plemniki martwe z PST, plemniki żywe bez PST oraz plemniki żywe z PST (Rycina 5.3.). W badaniu obecność aktywnej formy c3 były to: plemniki martwe bez aktywnej formy c3, plemniki martwe z aktywną formą c3, plemniki żywe bez aktywnej formy c3 oraz plemniki żywe z aktywną formą c3 (Rycina 5.4.). Komórki aneksynododatnie i kaspazododatnie to gamety z wykładnikami apoptozy. Średnia ilość plemników z wykładnikami apoptozy dla wszystkich badanych próbek wyniosła $\pm 8\%$ w przypadku gamet z PST i $\pm 26\%$ dla gamet z aktywną formą c3.



Rycina 5.3. Analiza cytometryczna zawartości plemników z błonową translokacją fosfatydyloseryny (PST) (barwienie aneksyną-V znakowaną fluoresceiną) z uwzględnieniem ich żywotności (barwienie jodkiem propidionowym) w przykładowych próbkach plemników wykorzystanych do zapłodnienia IVF. Na rycinach podano w kwadrancie górnym lewym odsetek plemników martwych bez PST, w kwadrancie górnym prawym odsetek plemników martwych z PST, w kwadrancie dolnym lewym odsetek plemników żywych bez PST, a w kwadrancie dolnym prawym odsetek plemników żywych z PST. A. przykładowy pacjent z niskim odsetkiem plemników z PST; B. przykładowy pacjent z wysokim odsetkiem plemników z PST. Oznaczenia: FL1-H – kanał fluorescencji 515-545 nm; FL3-H – kanał fluorescencji >650 nm.



Rycina 5.4. Cytometryczna ocena ilości plemników z aktywną formą kaspazy-3 (barwienie FITC-DEVD-FMK) z uwzględnieniem żywotności plemników (barwienie jodkiem propidionowym) w przykładowych próbkach plemników wykorzystanych do zapłodnienia IVF. Na rycinach podano w kwadrancie górnym lewym odsetek plemników martwych bez aktywnej formy kaspazy-3, w kwadrancie górnym prawym odsetek plemników martwych z aktywną formą kaspazy-3, w kwadrancie dolnym lewym odsetek plemników żywych bez aktywnej formy kaspazy-3, a w kwadrancie dolnym prawym odsetek plemników żywych z aktywną formą kaspazy-3. A. przykładowy pacjent z niskim odsetkiem plemników z aktywną formą kaspazy-3., B. przykładowy pacjent z wysokim odsetkiem plemników z aktywną formą kaspazy-3. Oznaczenia: FL1-H – kanał fluorescencji 515-545 nm; FL3-H – kanał fluorescencji >650 nm.

5.2.3. Ocena zależności podstawowych parametrów nasienia i wykładników apoptozy plemników

Obliczono korelację pomiędzy koncentracją, ruchliwością ruchem postępowym, morfologią i żywotnością gamet męskich, a odsetkiem plemników z badanymi wykładnikami apoptozy. W grupie badanej wszystkie parametry nasienia wykazały silną ujemną korelację zarówno z błonową PST jak i z obecnością aktywnej formy c3. Wykazano także silną dodatnią korelację między plemnikami z błonową PST, a odsetkiem plemników z aktywną formą c3 ($r=0,6$, $p<0,001$). Wyniki przedstawiono w tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Korelacja podstawowych parametrów nasienia z obecnością w plemnikach wykładników apoptozy

	Plemniki z PST [%]	Plemniki z aktywną formą c3 [%]
Koncentracja [mln/ml]	-0,4*	-0,5**
Plemniki poruszające się ruchem postępowym [%]	-0,4**	-0,6**
Plemniki o prawidłowej morfologii [%]	-0,3*	-0,4*
HOS [%]	-0,3*	-0,5**
Plemniki z PST [%]	-	0,6**
Plemniki z aktywną formą c3 [%]	0,6**	-

* p<0,001; ** p<0,0001; PST – błonowa translokacja fosfatydyloseryny, c3 – kaspaza-3, HOS – test hiposmotyczny; współczynnik korelacji rang Spearmana

5.3. Ocena związku podstawowych parametrów nasienia i wyników zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody zapłodnienia pozaustrojowego

W tabeli 5.3. przedstawiono dane dotyczące podstawowych parametrów nasienia w grupie badanej w zależności od zastosowanej metody zapłodnienia pozaustrojowego. Zwraca uwagę fakt, że istnieje statystycznie istotna różnica koncentracji, ruchliwości ruchem postępowym plemników, ich morfologii oraz żywotności między grupą A (konwencjonalne IVF) a grupą B (ICSI) (p<0,05 dla wszystkich wymienionych parametrów nasienia). Jednak porównując wykładniki apoptozy plemników nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą A i B ani w przypadku plemników z PST, ani w przypadku plemników z aktywną formą c3 (p>0,05 dla obu parametrów).

W grupach A i B dokonano dodatkowego podziału na dwie podgrupy: 1, w której doszło do zapłodnienia (zaobserwowano prawidłowe przedjądrza w co najmniej jednym oocycie poddanym procedurze) oraz 2, w której nie doszło do zapłodnienia (brak przedjądrzy w żadnym oocycie). Porównanie parametrów nasienia w podgrupach z dokonaniem i nie dokonaniem zapłodnienia w obrębie grup A i B przedstawiono w tabeli 5.4. W obrębie grupy A zwraca uwagę fakt, iż nie ma istotnych statystycznie różnic koncentracji, ruchliwości i morfologii plemników między podgrupami 1 i 2 (p>0,05 dla wszystkich wymienionych parametrów). Zauważono jednak istotną statystycznie różnicę dla żywotności plemników oraz wykładników apoptozy gamet między podgrupami w których doszło i nie doszło do zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF. W grupie B nie zauważono różnic istotnych

statystycznie między podgrupami 1 i 2 dla żadnego z opisywanych parametrów nasienia.

Tabela 5.3. Parametry nasienia oraz wykładniki apoptozy plemników w zależności od zastosowanej metody zapłodnienia

	A		B		P
	Średnia ± SD	Mediana	Średnia ± SD	Mediana	
Koncentracja [mln/ml]	39±16	40	18±18	13	<0,0001*
Plemniki poruszające się ruchem postępowym [%]	25±9	21	14±10	12	<0,0001*
Plemniki o prawidłowej morfologii [%]	5±2	5	3±2	3	<0,0001*
HOS [%]	62±11	63	48±19	50	<0,0001**
Plemniki z PST [%]	5±4	4	9±12	5	0,2*
Plemniki z aktywną formą c3 [%]	21±20	15	28±25	18	0,1*

A – grupa pacjentów poddanych konwencjonalnemu IVF, B – grupa pacjentów poddanych ICSI; PST – translokacja fosfatydyloseryny, c3 – kaspaza-3, HOS – test hipoosmotyczny, IVF - zapłodnienie pozaustrojowe, ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika, SD – odchylenia standardowe; *- test U Manna-Whitneya; **-test t Studenta

Tabela 5.4. Parametry nasienia oraz wykładniki apoptozy plemników w zależności od zastosowanej metody IVF z uwzględnieniem skuteczności zapłodnienia

A

	1 (zapłodnienie)		2 (brak zapłodnienia)		p
	Średnia ±SD	Mediana	Średnia ±SD	Mediana	
Koncentracja [mln/ml]	40±16	40	37±14	35	>0,05**
Plemniki poruszające się ruchem postępowym [%]	26±9	32	20±7	20	>0,05*
Plemniki o prawidłowej morfologii [%]	5±1	5	5±2	5	>0,05*
HOS [%]	64±10	64	52±9	49	<0,05**
Plemniki z PST [%]	4±3	3	9±4	9	<0,05*
Plemniki z aktywną formą c3 [%]	16±15	13	43±27	52	<0,05**

B

	1 (zapłodnienie)		2 (brak zapłodnienia)		p
	Średnia ±SD	Mediana	Średnia ±SD	Mediana	
Koncentracja [mln/ml]	18±18	13	18±12	12	>0,05*
Plemniki poruszające się ruchem postępowym [%]	14±10	12	17±13	14	>0,05**
Plemniki o prawidłowej morfologii [%]	3±2	4	4±2	3	>0,05*
HOS [%]	48±20	50	50±16	52	>0,05**
Plemniki z PST [%]	9±12	5	7±7	4	>0,05*
Plemniki z aktywną formą c3 [%]	30±25	19	13±9	15	>0,05*

A – grupa pacjentów poddanych konwencjonalnemu IVF, B – grupa pacjentów poddanych ICSI, 1 – doszło do zapłodnienia, 2 – nie doszło do zapłodnienia; PST – translokacja fosfatydyloseryny, c3 – kaspaza-3, HOS – test hiposmotyczny, IVF - zapłodnienie pozaustrojowe, ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika, SD – odchylenia standardowe; * - test U Manna-Whitneya; ** - test t Studenta

5.4. Występowanie polimorfizmów genu receptora estrogenowego 1.

DNA do badania polimorfizmów *ESR1* wyizolowano u 102 pacjentów. Genotypy *PvuII* i *XbaI* oceniono we wszystkich próbkach. W grupie A uzyskano materiał do badań genetycznych polimorfizmów genu *ESR1* u 36 mężczyzn, a w grupie B u 66. Obliczono zgodność rozkładu genotypów badanych miejsc restrykcyjnych z prawem równowagi Hardy-Weinberga (tabela 5.5. i tabela 5.6.). Zarówno w przypadku *PvuII* jak i *XbaI* potwierdzono rozkład populacyjny zgodny z tym prawem ($p > 0,05$) (Rodriguez i wsp., 2009).

Tabela 5.5. Rozkład genotypów *PvuII* i ocena równowagi Hardy-Weinberga

<i>PvuII</i>	n	allel T	allel C	n obserwowane	% obserwowane	n oczekiwane	% oczekiwane	χ^2	P
TT	24	48	0	24	24	24	24	0,01	
TC	52	52	52	52	51	51	50	0,02	
CC	26	0	52	26	25	27	26	0,01	
suma genotypy	102	100	104	102	100	102	100	0,04	0,84
suma allele	204	0,49	0,51	204					

n – liczba pacjentów

Tabela 5.6. Rozkład genotypów *XbaI* i ocena równowagi Hardy-Weinberga

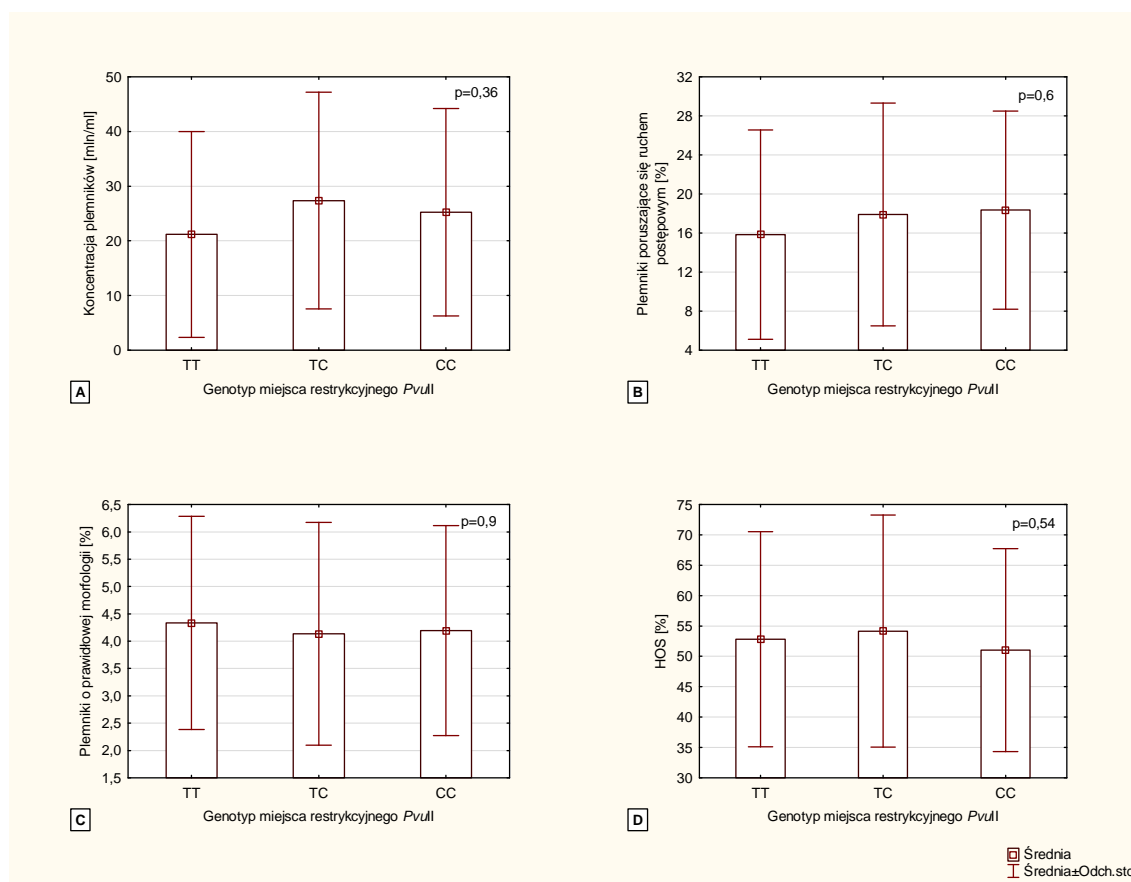
<i>XbaI</i>	n	allel A	allel G	n obserwowane	% obserwowane	n oczekiwane	% oczekiwane	χ^2	P
AA	18	36	0	18	18	16	16	0,23	
AG	45	45	45	45	44	49	48	0,3	
GG	39	0	78	39	38	37	36	0,1	
suma genotypy	102	81	123	102	100	102	100	0,63	0,43
suma allele	204	0,4	0,6	204					

n – liczba pacjentów

5.4.1. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *PvuII* a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników

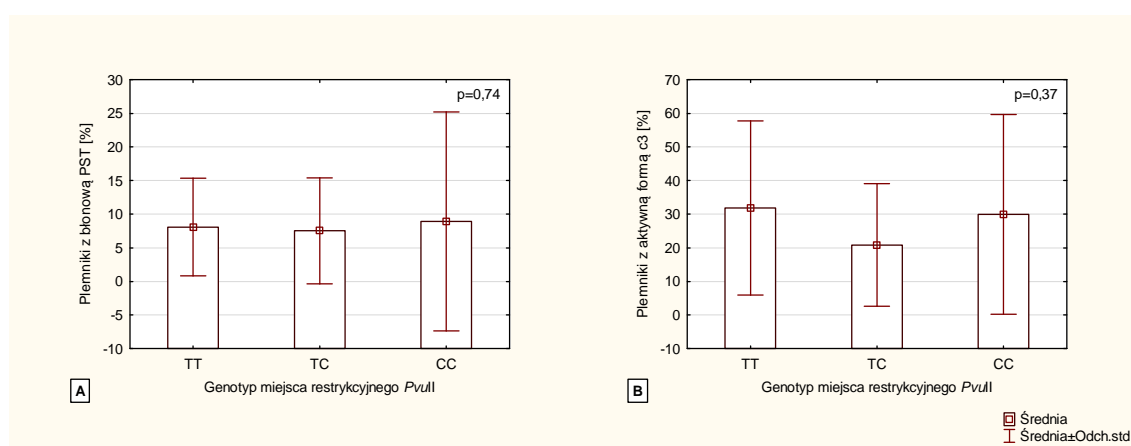
W całej badanej populacji porównano koncentrację, ruchliwość ruchem postępowym, morfologię i żywotność plemników między poszczególnymi genotypami miejsca restrykcyjnego *PvuII*. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic tych parametrów między genotypami TT, TC i CC ($p > 0,05$ dla wszystkich parametrów) (Wykres 5.1.).

Porównano także odsetki plemników z wykładnikami apoptozy u pacjentów z poszczególnymi genotypami miejsca restrykcyjnego *PvuII*. Nie zaobserwowano wyższego odsetka plemników z błonową PST w obrębie żadnego z genotypów ($p > 0,05$). Podobnie w przypadku występowania w gametach aktywnej formy c3 – nie zauważono zależności z żadnym z SNP genu kodującego ESR1 rozpoznawanym przez enzym restrykcyjny *PvuII* ($p > 0,05$). Wyniki zilustrowano na wykresie 5.2.



Wykres 5.1. Porównanie parametrów nasienia pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *PvuII* (test Kruskala-Wallis).

A – Porównanie koncentracji plemników w zależności od genotypu *PvuII*; B – Porównanie odsetka plemników poruszających się ruchem postępowym w zależności od genotypu *PvuII*; C – Porównanie odsetka plemników o prawidłowej morfologii w zależności od genotypu *PvuII*; D – Porównanie żywotności plemników w zależności od genotypu *PvuII*; HOS – test hipoosmotyczny



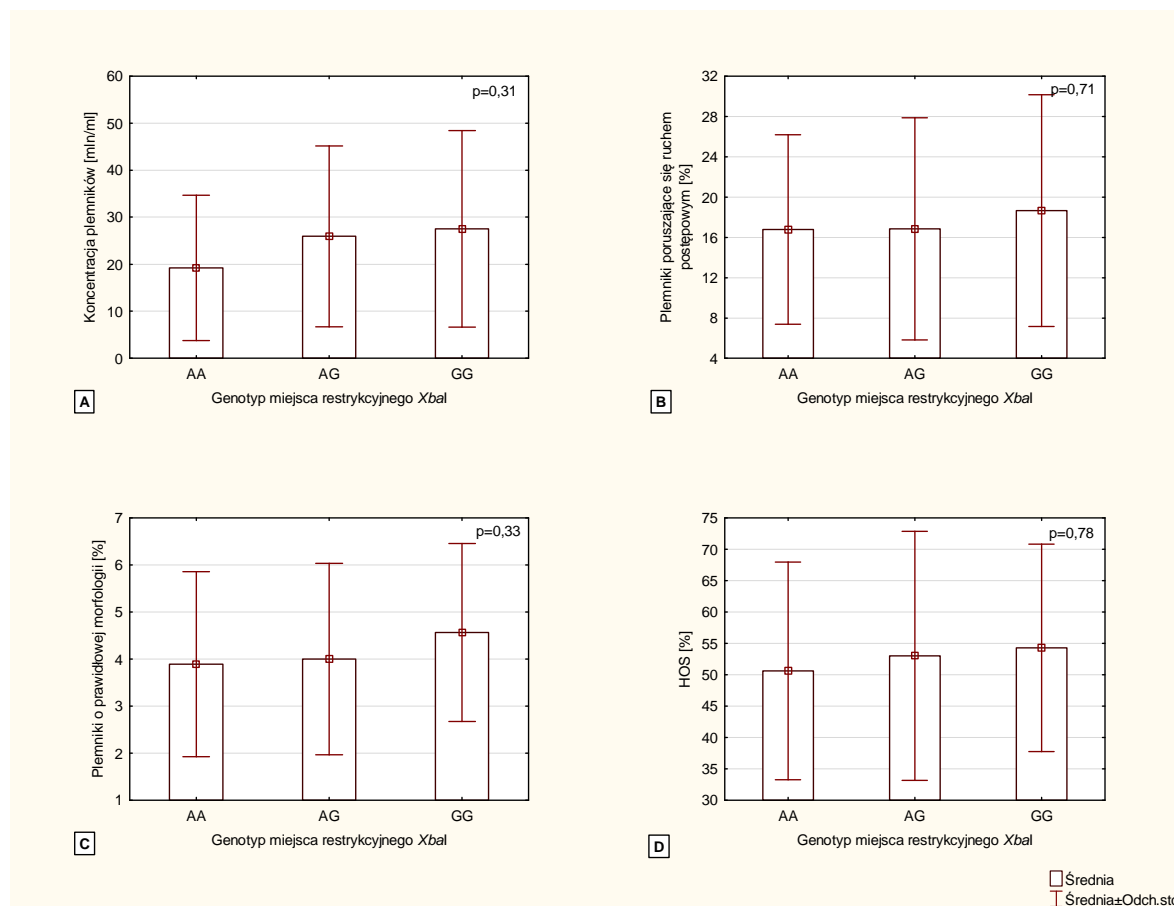
Wykres 5.2. Porównanie wykładników apoptozy pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *PvuII* (test Kruskala-Wallis).

A – Porównanie odsetka plemników z błonową PST w zależności od genotypu *PvuII*; B – Porównanie odsetka plemników z aktywną formą c3 w zależności od genotypu *PvuII*; PST – translokacja fosfatydoseryny; c3 – kaspaza-3

5.4.2. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *Xba*I a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników

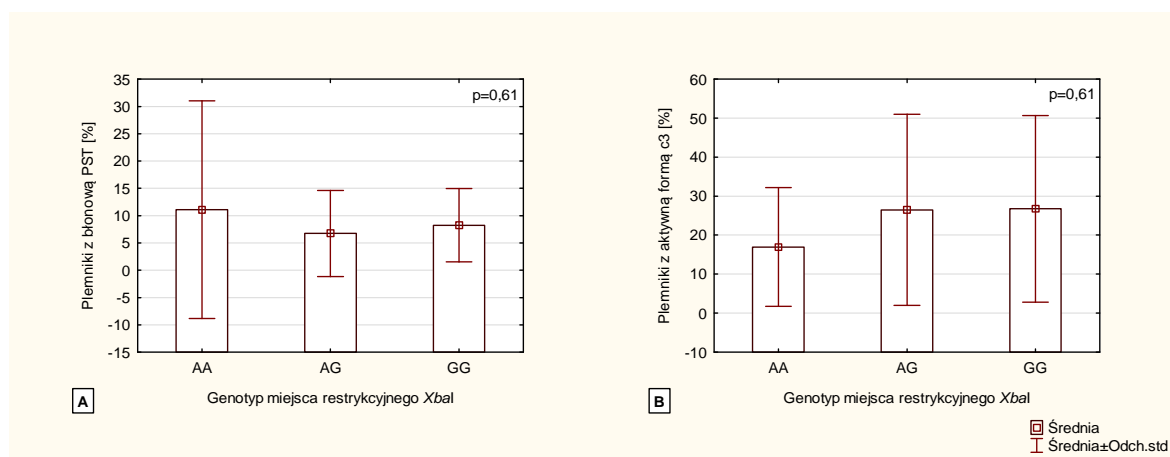
W grupie badanej wykonano analizę porównawczą podstawowych parametrów nasienia (koncentracji, ruchliwości ruchem postępowym, morfologii i żywotności plemników) w zależności od genotypu miejsca restrykcyjnego *Xba*I. Nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych między parametrami nasienia w obrębie poszczególnych genotypów ($p > 0,05$). Wyniki przedstawiono na wykresie 5.3.

Na wykresie 5.4. zilustrowano porównanie wykładników apoptozy w obrębie genotypów miejsca restrykcyjnego *Xba*I. Nie zauważono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy badanymi genotypami w zakresie odsetka plemników z PST ($p > 0,05$) oraz odsetka gamet z aktywną formą c3 ($p > 0,05$).



Wykres 5.3. Porównanie parametrów nasienia pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *Xba*I (test Kruskala-Wallisa).

A – Porównanie koncentracji plemników w zależności od genotypu *Xba*I; B - Porównanie odsetka plemników poruszających się ruchem postępowym w zależności od genotypu *Xba*I; C – Porównanie odsetka plemników o prawidłowej morfologii w zależności od genotypu *Xba*I; D - Porównanie żywotności plemników w zależności od genotypu *Xba*I; HOS – test hipoosmotyczny

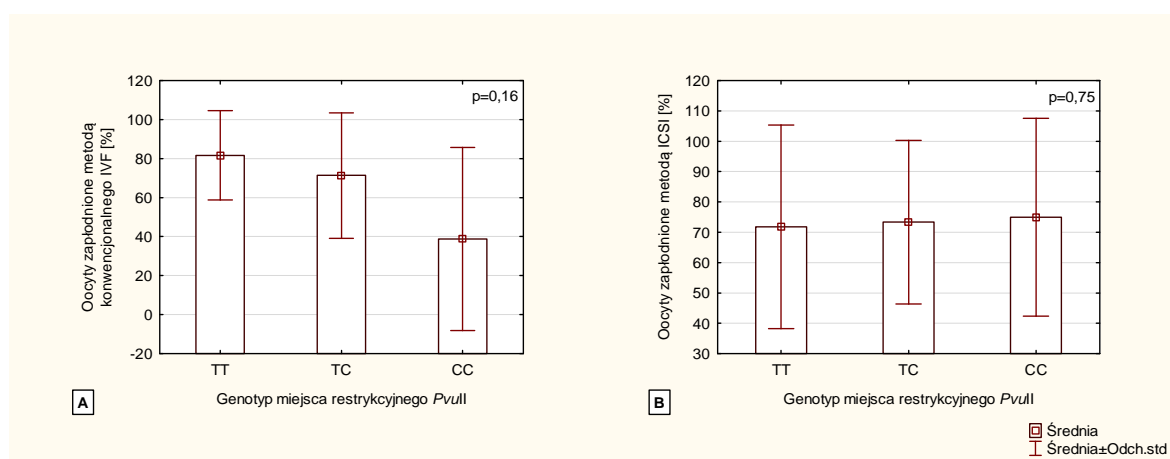


Wykres 5.4. Porównanie wykładników apoptozy pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *XbaI* (test Kruskala-Wallisa).

A – Porównanie odsetka plemników z błonową PST w zależności od genotypu *XbaI*; B - Porównanie odsetka plemników z aktywną formą c3 w zależności od genotypu *XbaI*; PST – translokacja fosfatydyloseryny, c3 – kaspaza-3

5.4.3. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *PvuII* a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF

Dokonano porównania skuteczności zapłodnienia w grupach A i B w odniesieniu do poszczególnych genotypów miejsca restrykcyjnego *PvuII*. Nie uzyskano znamiennej różnicy między genotypami zarówno w grupie, w której zastosowano metodę konwencjonalną IVF (A) jak i w grupie, w której zastosowano ICSI (B). Wyniki przedstawiono na wykresie 5.5.

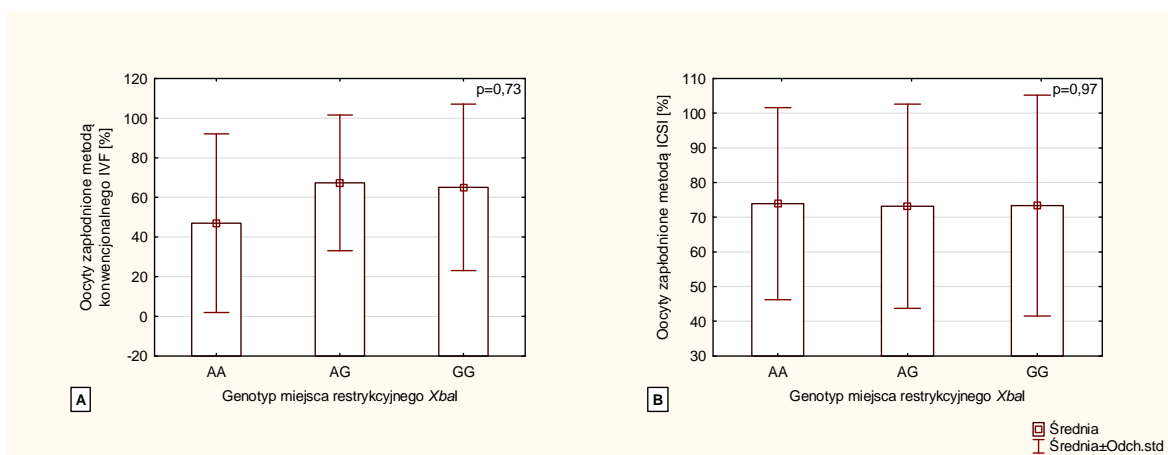


Wykres 5.5. Porównanie skuteczności zapłodnienia w zależności od rodzaju zastosowanej metody IVF w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *PvuII* (test Kruskala-Wallisa).

A – Wykres porównania odsetka oocytów zapłodnionych metodą konwencjonalnego IVF w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *PvuII*; B - Wykres porównania odsetka oocytów zapłodnionych metodą ICSI w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *PvuII*; IVF – zapłodnienie pozaustrojowe, ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika

5.4.4. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *XbaI* a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF

Porównano odsetki oocytów zapłodnionych metodą konwencjonalnego IVF (grupa A) oraz metodą ICSI (grupa B) w zależności od genotypu miejsca restrykcyjnego *XbaI*. Dla żadnej z metod IVF nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy skuteczności zapłodnienia między genotypami ($p > 0,05$ w przypadku konwencjonalnego IVF oraz $p > 0,05$ w przypadku ICSI). (Wykres 5.6.)



Wykres 5.6. Porównanie skuteczności zapłodnienia w zależności od rodzaju zastosowanej metody IVF w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *XbaI*.

A – Wykres porównania odsetka oocytów zapłodnionych metodą konwencjonalnego IVF w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *XbaI*; B - Wykres porównania odsetka oocytów zapłodnionych metodą ICSI w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *XbaI*; IVF – zapłodnienie pozaustrojowe, ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika

5.4.5. Ocena zależności poszczególnych genotypów miejsc restrykcyjnych *PvuII* oraz *XbaI* i parametrów nasienia oraz skuteczności zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF oraz ICSI

Grupę badaną (A+B) podzielono według parametrów nasienia na następujące podgrupy: o koncentracji < 15 mln/ml i ≥ 15 mln/ml, o ruchliwości ruchem postępowym $< 32\%$ i $\geq 32\%$, o prawidłowej morfologii $< 4\%$ i $\geq 4\%$ i o żywotności (HOS) $< 58\%$ i $\geq 58\%$. W grupach tych przy pomocy testu χ^2 sprawdzono, czy istnieją zależności genotypów miejsca restrykcyjnego *PvuII* oraz *XbaI* i badanych cech. Następnie z całej badanej populacji (A+B) wydzielono pacjentów z normozoospermia (koncentracja, ruchliwość i odsetek plemników o prawidłowej morfologii w zakresie normy według WHO z 2010 roku) i przeprowadzono analizę zależności występowania normozoospermii i poszczególnych genotypów *PvuII* oraz *XbaI* (WHO, 2010). Wreszcie oceniono zależności genotypów badanych miejsc restrykcyjnych

i skuteczności zapłodnienia pozaustrojowego metodą konwencjonalnego IVF (grupa A) i ICSI (grupa B), dzieląc populację na podgrupy z dokonanym i nie dokonanym zapłodnieniem w co najmniej jednej komórce jajowej.

W obrębie genotypów miejsca restrykcyjnego *PvuII* nie zaobserwowano zależności z parametrami nasienia ($p > 0,05$ dla koncentracji, ruchliwości, morfologii i żywotności plemników). Podobnie zależności tych nie stwierdzono dla genotypów miejsca restrykcyjnego *XbaI*. Nie zauważono związku badanych wariantów genetycznych, zarówno w miejscu *PvuII* jak i *XbaI*, z występowaniem normozoospermii ($p > 0,05$ dla obu miejsc restrykcyjnych). W grupie A stwierdzono zależność genotypu TC miejsca restrykcyjnego *PvuII* ze skutecznością zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF ($p < 0,05$). Podobnych wyników nie uzyskano jednak dla miejsca *XbaI* ($p > 0,05$), ani też w przypadku zapłodnienia metodą ICSI ($p > 0,05$ dla wszystkich odmian *XbaI* i *PvuII* zarówno w grupie B). Wyniki przedstawiono w tabeli 5.7.

Tabela 5.7. Ocena związku poszczególnych genotypów miejsca restrykcyjnego *PvuII* oraz *XbaI* z parametrami nasienia oraz skutecznością zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF oraz ICSI

Genotyp	n	Miejsce restrykcyjne <i>PvuII</i>			p	Miejsce restrykcyjne <i>XbaI</i>			p
		TT	TC	CC		AA	AG	GG	
Koncentracja < 15 mln/ml	102	11	16	8	0,396*	7	14	14	0,812*
Koncentracja ≥ 15 mln/ml		13	36	18		11	31	25	
Ruchliwość ruchem postępowym	102	19	38	20	0,832*	15	35	27	0,46*
Ruchliwość ruchem postępowym		5	14	6		3	10	12	
Prawidłowa morfologia < 4%	102	8	17	8	0,978*	7	16	10	0,505*
Prawidłowa morfologia ≥ 4%		16	35	18		11	29	29	
HOS < 58 %	102	12	25	17	0,334*	11	23	20	0,746*
HOS ≥ 58 %		12	27	9		7	22	19	
Brak normozoospermii	102	19	39	21	0,826*	16	36	27	0,22*
Normozoospermia		5	13	5		2	9	12	
Grupa A - nie doszło do zapłodnienia	36	0	2	5	0,019**	1	2	4	0,606**
Grupa A - doszło do zapłodnienia		6	18	5		3	14	12	
Grupa B - nie doszło do zapłodnienia	66	2	2	1	0,84**	1	2	2	0,161**
Grupa B - doszło do zapłodnienia		16	30	15		13	27	21	

A – grupa pacjentów poddanych konwencjonalnemu IVF, B – grupa pacjentów poddanych ICSI, IVF – zapłodnienie pozaustrojowe, ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika; HOS – test hipoosmotyczny; n – liczba pacjentów poddanych analizie; * - test χ^2 , ** - test dokładny Fishera w rozszerzeniu Freemana-Haltona

5.5. Występowanie polimorfizmów genu receptora estrogenowego 2.

Skuteczną ocenę genotypów miejsca restrykcyjnego *AluI* przeprowadzono u 92 pacjentów. Ocena genotypów *RsaI* powiodła się w 87 przypadkach. Wyniki analizy *AlwNI* uzyskano u 96 pacjentów. Zwraca uwagę fakt, że w przypadku miejsca restrykcyjnego *RsaI* nie uzyskano genotypu AA u żadnego z badanych mężczyzn. Genotypem dominującym był typ dziki – GG. Ponadto w poddanej analizie grupie typ dziki *AluI* (AA) wystąpił najrzadziej, zaś typ dziki *AlwNI* (CC) – najczęściej. Rozkłady genotypów wszystkich miejsc restrykcyjnych były zgodne z prawem Hardy-Weinberga. (tabele 5.8-5.10).

Tabela 5.8. Rozkład genotypów *AluI* i ocena równowagi Hardy-Weinberga

<i>AluI</i>	n	allel A	allel G	n obserwowane	% obserwowane	n oczekiwane	% oczekiwane	χ^2	P
AA	8	16	0	8	9	8	9	0,01	
AG	39	39	39	39	42	39	42	0,01	
GG	45	0	90	45	49	45	49	<0,01	
suma genotypy	92	55	129	92	100	92	100	0,01	0,91
suma allele	184	0,3	0,7	184					

n – liczba pacjentów

Tabela 5.9. Rozkład genotypów *RsaI* i ocena równowagi Hardy-Weinberga

<i>RsaI</i>	n	allel G	allel A	n obserwowane	% obserwowane	n oczekiwane	% oczekiwane	χ^2	P
GG	79	158	0	79	91	79,18	91,02	<0,001	
GA	8	8	8	8	9	7,64	8,77	0,02	
AA	0	0	0	0	0	0,18	0,21	0,18	
suma genotypy	87	166	8	87	100	87	100	0,20	0,65
suma allele	174	0,95	0,05	174					

n – liczba pacjentów

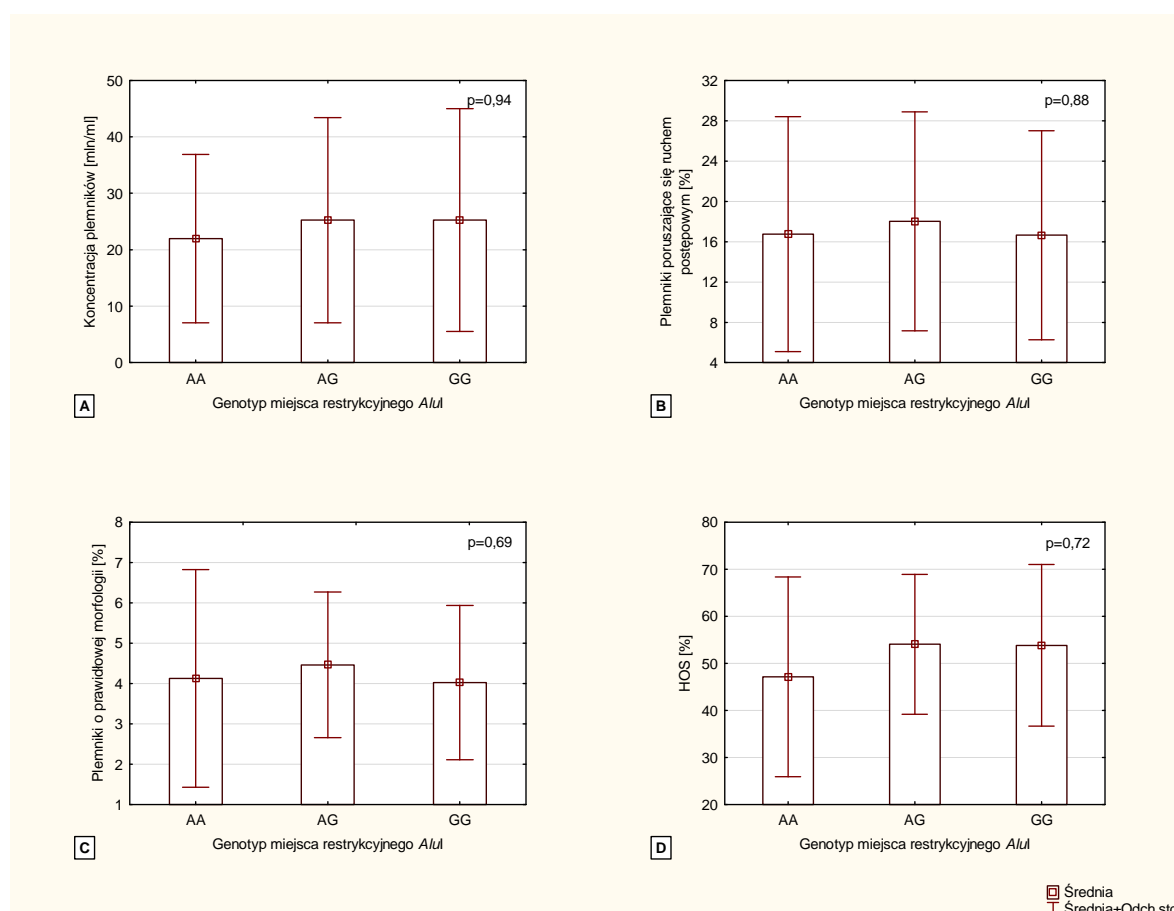
Tabela 5.10. Rozkład genotypów *AlwNI* i ocena równowagi Hardy-Weinberga

<i>AlwNI</i>	n	allel C	allel T	n obserwowane	% obserwowane	n oczekiwane	% oczekiwane	χ^2	P
CC	64	128	0	64	67	63	66	<0,001	
CT	28	28	28	28	29	30	30	0,05	
TT	4	0	8	4	4	3	4	0,12	
suma genotypy	96	156	36	96	100	96	100	0,18	0,68
suma allele	192	0,81	0,19	192					

n – liczba pacjentów

5.5.1. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *AluI* a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników

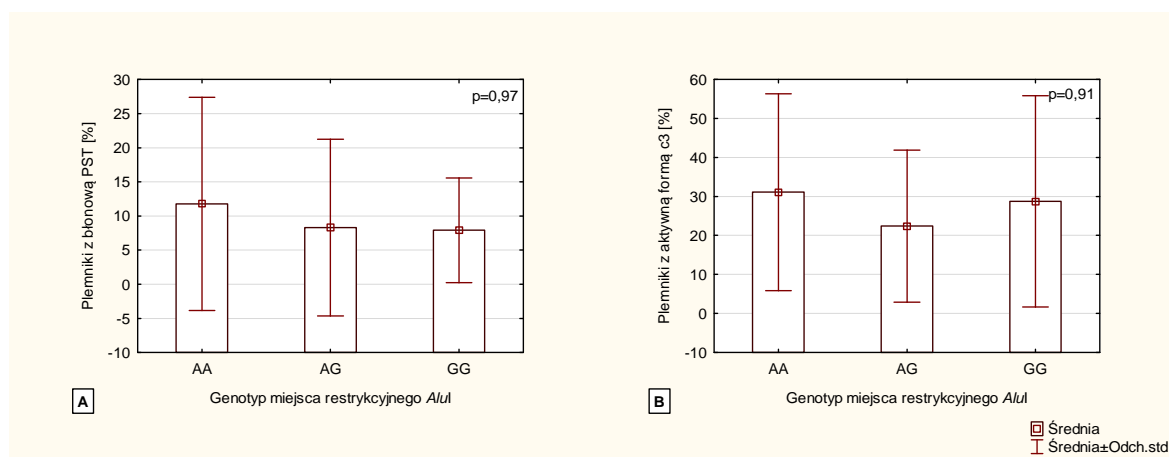
W całej grupie poddanej analizie porównano parametry nasienia między poszczególnymi genotypami miejsca restrykcyjnego *AluI*. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między genotypami AA, AG i GG w przypadku żadnego z badanych parametrów ($p > 0,05$ dla koncentracji, ruchliwości plemników ruchem postępowym, prawidłowej morfologii plemników oraz żywotności gamet). Wyniki przedstawiono na wykresie 5.7.



Wykres 5.7. Porównanie parametrów nasienia pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *AluI* (test Kruskala-Wallis).

A – Porównanie koncentracji plemników w zależności od genotypu *AluI*; B – Porównanie odsetka plemników poruszających się ruchem postępowym w zależności od genotypu *AluI*; C – Porównanie odsetka plemników o prawidłowej morfologii w zależności od genotypu *AluI*; D – Porównanie żywotności plemników w zależności od genotypu *AluI*; HOS – test hipoosmotyczny

W podobny sposób przeprowadzono porównanie wykładników apoptozy między poszczególnymi genotypami *AluI*. Także w tym przypadku nie uzyskano różnic statystycznych ($p > 0,05$ zarówno w zakresie błonowej PST jak i komórek z aktywną formą c3). Ilustracja analizy na wykresie 5.8.



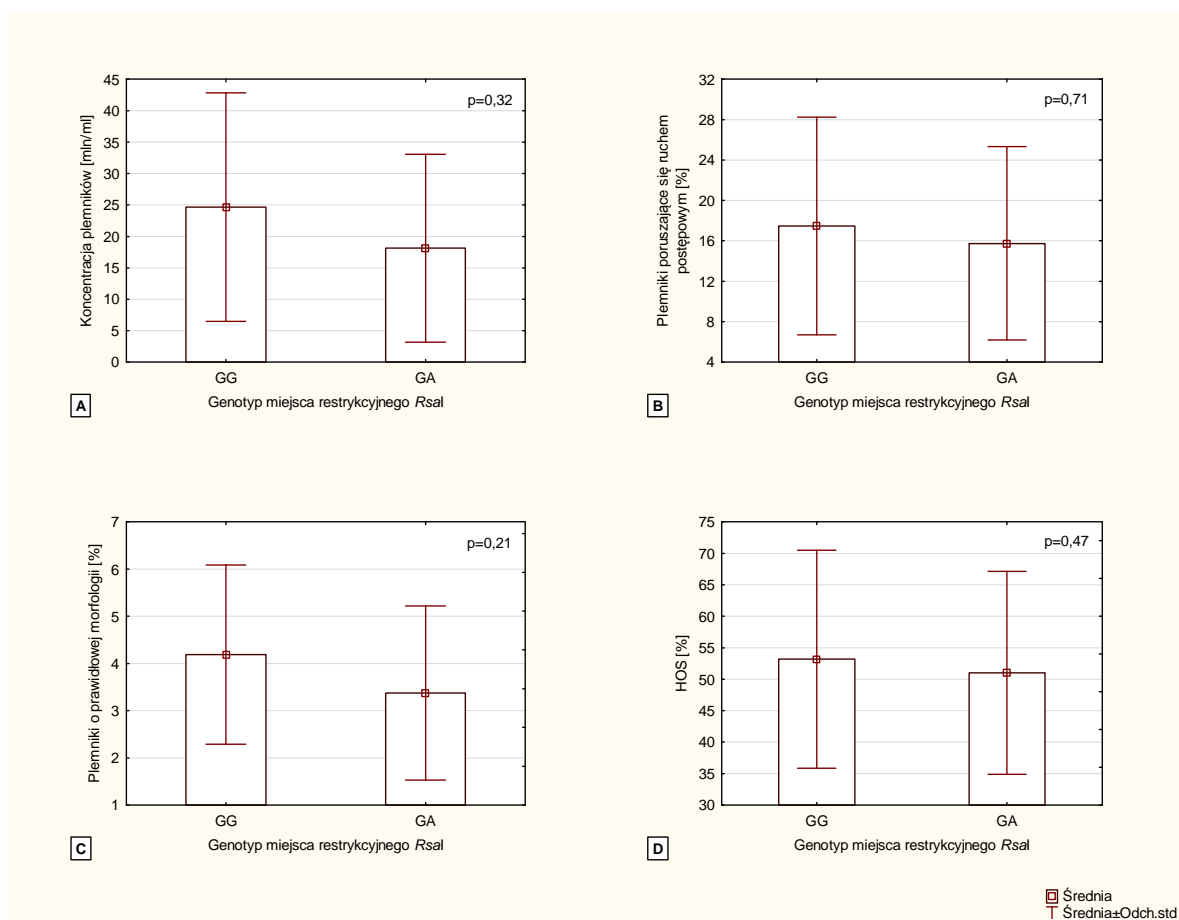
Wykres 5.8. Porównanie wykładników apoptozy pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *AluI* (test Kruskala-Wallis).

A – Porównanie odsetka plemników z PST w zależności od genotypu *AluI*; B – Porównanie odsetka plemników z aktywną formą c3 w zależności od genotypu *AluI*; PST – translokacja fosfatydyloseryny; c3 – kaspaza-3

5.5.2. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *RsaI* a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników

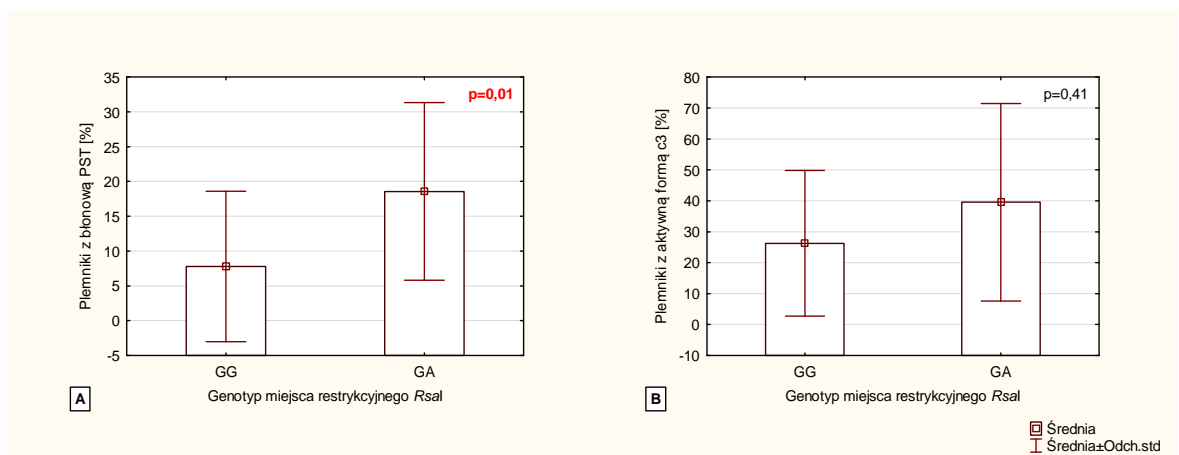
Koncentrację, ruchliwość plemników ruchem postępowym, morfologię gamet i ich żywotność porównano także między genotypami miejsca restrykcyjnego *RsaI*. Badane parametry nie różniły się statystycznie pomiędzy genotypami GG i GA (w każdym przypadku $p>0,05$). (Wykres 5.9.)

Na wykresie 5.10. przedstawiono wyniki porównania wykładników apoptozy między genotypami *RsaI*. Stwierdzono istotnie większy odsetek komórek z PST w przypadku genotypu GG niż genotypu GA ($p=0,01$). Żaden z genotypów nie był jednak związany ze zwiększoną obecnością plemników z aktywną formą c3 ($p>0,05$).



Wykres 5.9. Porównanie parametrów nasienia pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *RsaI* (test U Manna-Whitneya).

A – Porównanie koncentracji plemników w zależności od genotypu *RsaI*; B – Porównanie odsetka plemników poruszających się ruchem postępowym w zależności od genotypu *RsaI*; C – Porównanie odsetka plemników o prawidłowej morfologii w zależności od genotypu *RsaI*; D – Porównanie żywotności plemników w zależności od genotypu *RsaI*; HOS – test hipoosmotyczny



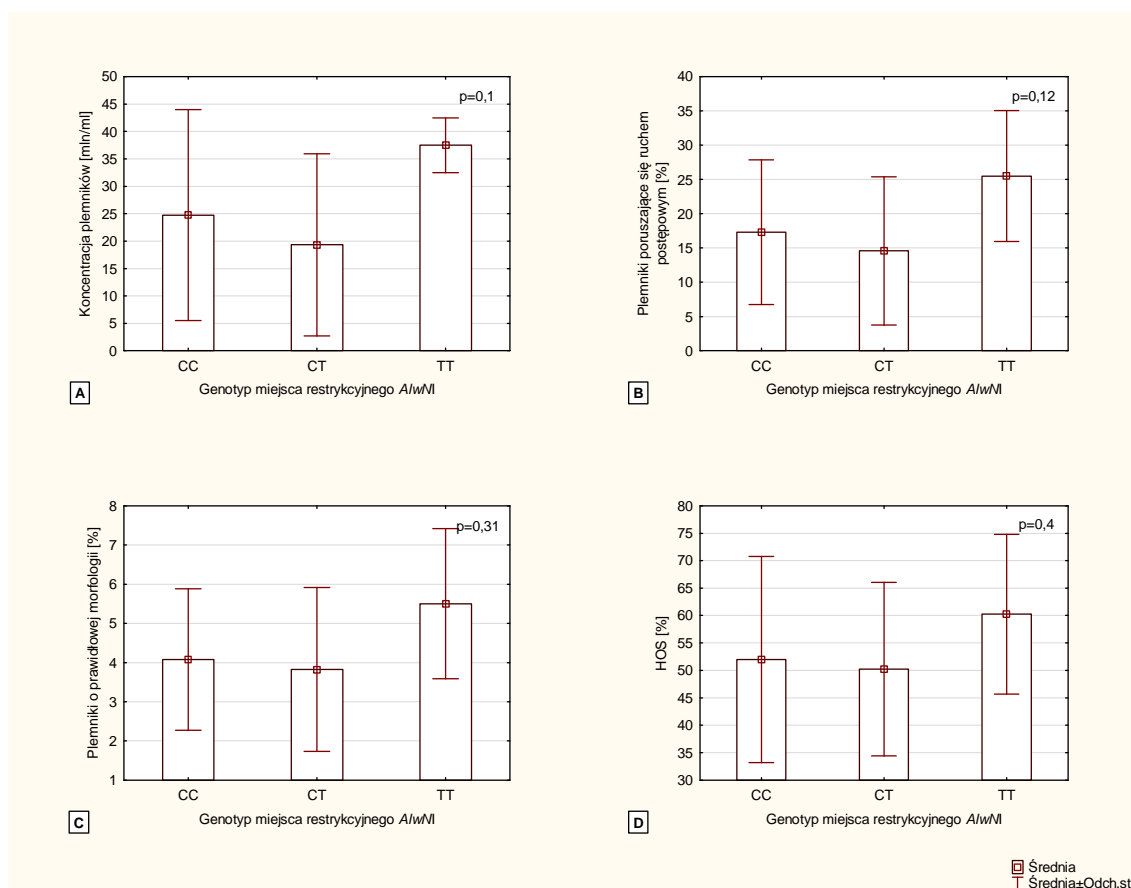
Wykres 5.10. Porównanie wykładników apoptozy pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *RsaI* (test U Manna-Whitneya)

A – Porównanie odsetka plemników z błonową PST w zależności od genotypu *RsaI*; B – Porównanie odsetka plemników z aktywną formą c3 w zależności od genotypu *RsaI*; PST – translokacja fosfatydyloseryny; c3 – kaspaza-3

5.5.3. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *AlwMI* a parametry nasienia i wykładniki apoptozy plemników

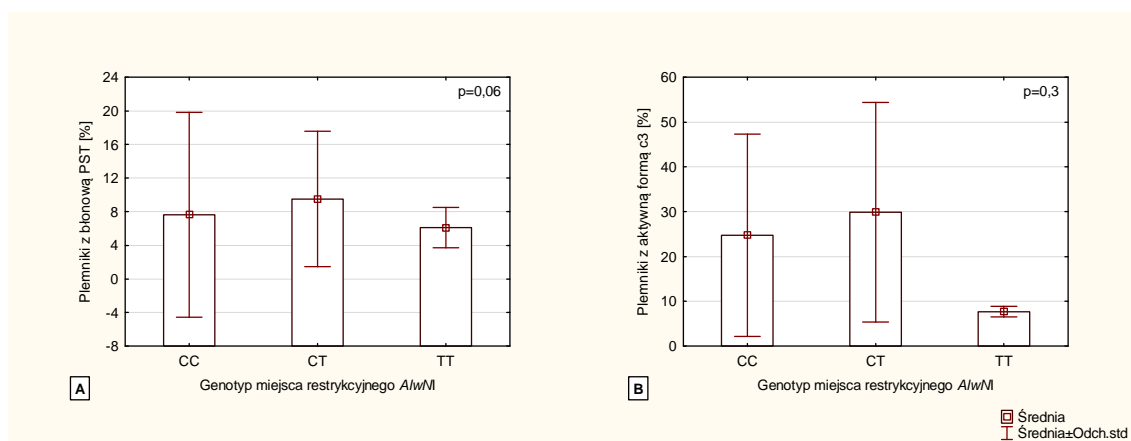
Przeprowadzono analizę porównawczą podstawowych parametrów seminologicznych między genotypami CC, CT i TT miejsca restrykcyjnego *AlwMI*. Nie zaobserwowano istotnych różnic dla koncentracji, ruchliwości ruchem postępowym, morfologii ani żywotności plemników ($p > 0,05$ dla wszystkich wymienionych cech). Wyniki analizy zilustrowano na wykresie 5.11.

Porównano także plemniki z wykładnikami apoptozy w zależności od genotypu *AlwMI* (wykres 5.12). Nie stwierdzono zależności między genotypami *AlwMI* a występowaniem błonowej PST. Podobnego związku nie zauważono również w zakresie komórek z aktywną formą c3 ($p > 0,05$ dla porównań obu wykładników apoptozy plemników między genotypami).



Wykres 5.11. Porównanie parametrów nasienia pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *AlwMI* (test Kruskala-Wallisa).

A – Porównanie koncentracji plemników w zależności od genotypu *AlwMI*; B – Porównanie odsetka plemników poruszających się ruchem postępowym w zależności od genotypu *AlwMI*; C – Porównanie odsetka plemników o prawidłowej morfologii w zależności od genotypu *AlwMI*; D – Porównanie żywotności plemników w zależności od genotypu *AlwMI*; HOS – test hipoosmotyczny

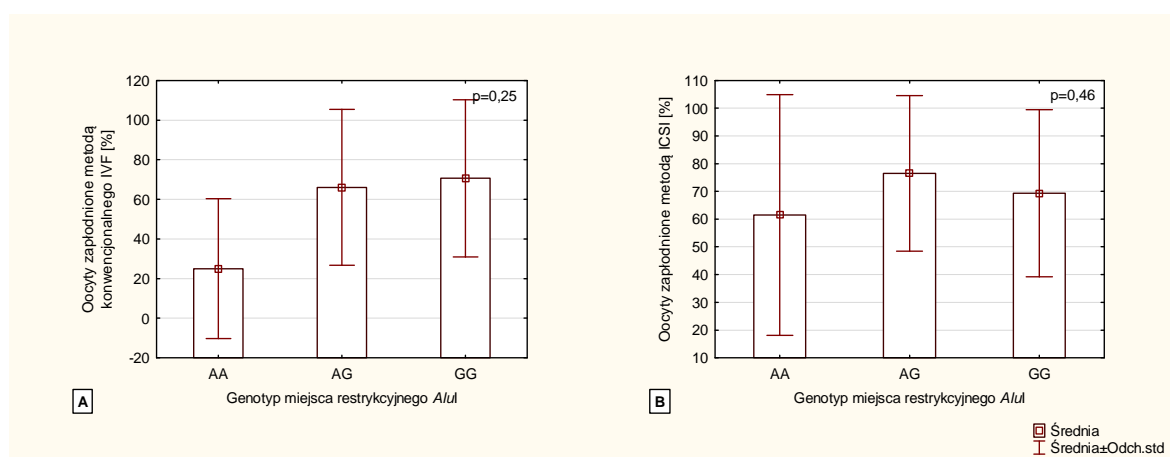


Wykres 5.12. Porównanie wykładników apoptozy pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *AlwMI* (test Kruskala-Wallisa).

A – Porównanie odsetka plemników z błonową PST w zależności od genotypu *AlwMI*; B – Porównanie odsetka plemników z aktywną formą c3 w zależności od genotypu *AlwMI*; PST – translokacja fosfatydyloseryny; c3 – kaspaza-3

5.5.4. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *AluI* a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF

Porównano skuteczność zapłodnienia pozaustrojowego pomiędzy genotypami miejsca restrykcyjnego *AluI* w zależności od zastosowanej metody IVF. W grupie konwencjonalnego IVF (A) nie zaobserwowano różnicy skuteczności zapłodnienia ($p > 0,05$). Podobnie w grupie ICSI (B) żaden z genotypów nie był związany z większą liczbą zapłodnionych oocytów ($p > 0,05$). Wyniki zilustrowano na wykresie 5.13.



Wykres 5.13. Porównanie skuteczności zapłodnienia w zależności od rodzaju zastosowanej metody IVF w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *AluI* (test Kruskala-Wallisa).

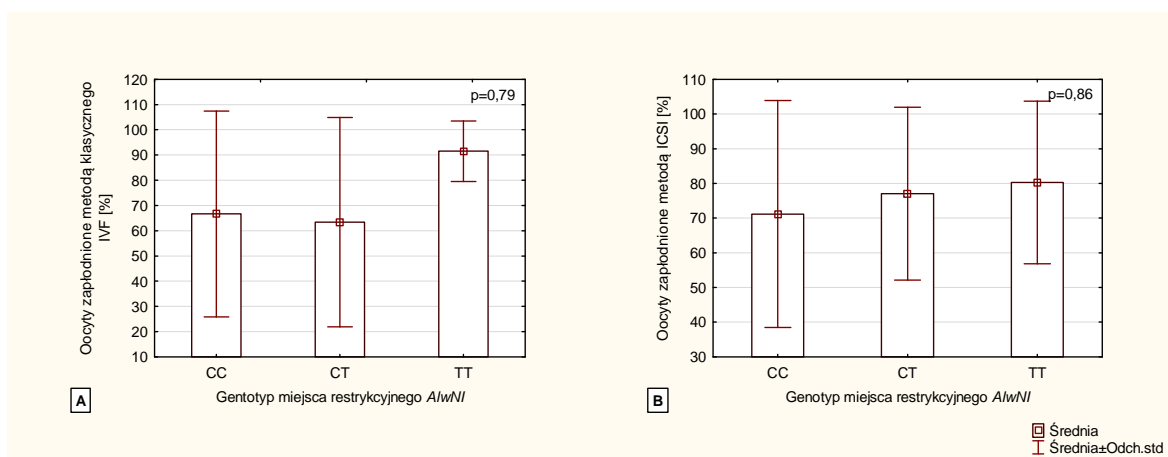
A – Wykres porównania odsetka oocytów zapłodnionych metodą konwencjonalnego IVF w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *AluI*; B - Wykres porównania odsetka oocytów zapłodnionych metodą ICSI w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *AluI*; IVF – zapłodnienie pozaustrojowe, ICSI – docyt oplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika

5.5.5. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *RsaI* a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF

Z uwagi na niewielką częstość występowania genotypu GA w grupie A oraz nie uzyskanie w badanej populacji wyniku AA, wyniki oceny zależności genotypów miejsca restrykcyjnego *RsaI* i skuteczności zapłodnienia oceniono przy pomocy testu χ^2 i przedstawiono w tabeli 5.11. (podrozdział 5.5.7.).

5.5.6. Polimorfizmy miejsca restrykcyjnego *AlwNI* a skuteczność zapłodnienia w zależności od zastosowanej metody IVF

Przeprowadzono porównanie odsetków zapłodnionych komórek jajowych pomiędzy poszczególnymi genotypami miejsca restrykcyjnego *AlwNI*. W grupie A (konwencjonalne IVF) nie stwierdzono związku żadnego z genotypów z odsetkiem zapłodnionych komórek jajowych ($p>0,05$). Podobnie w grupie B (ICSI) nie uzyskano różnic w skuteczności zapłodnienia między genotypami CC, CT i TT ($p>0,05$). Wyniki przedstawiono na wykresie 5.14.



Wykres 5.14. Porównanie skuteczności zapłodnienia w zależności od rodzaju zastosowanej metody IVF w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *AlwNI* (test Kruskala-Wallisa).

A – Wykres porównania odsetka oocytów zapłodnionych metodą konwencjonalnego IVF w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *AlwNI*; B - Wykres porównania odsetka oocytów zapłodnionych metodą ICSI w odniesieniu do genotypów miejsca restrykcyjnego *AlwNI*; IVF – zapłodnienie pozaustrojowe, ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika

5.5.7. Ocena zależności poszczególnych genotypów miejsc restrykcyjnych *AluI*, *RsaI* i *AlwNI* i parametrów nasienia oraz skuteczności zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF i ICSI

Podobnie jak w przypadku oceny genotypów *ESRI* w kontekście parametrów nasienia i wyników zapłodnienia pozaustrojowego, także dla oceny zależności

poszczególnych genotypów miejsc restrykcyjnych *AluI*, *RsaI* i *AlwNI* z tymi cechami populację badaną podzielono na podgrupy: o koncentracji plemników < 15 mln/ml i ≥ 15 mln/ml, o ruchliwości ruchem postępowym $< 32\%$ i $\geq 32\%$, o prawidłowej morfologii $< 4\%$ i $\geq 4\%$ i o żywotności (HOS) $< 58\%$ i $\geq 58\%$. Następnie z całej badanej populacji wydzielono pacjentów z normozoospermią (koncentracja, ruchliwość i odsetek plemników o prawidłowej morfologii w zakresie wartości referencyjnych według WHO) i przeprowadzono analizę zależności występowania normozoospermii i genotypów badanych miejsc restrykcyjnych *ESR2*. Wreszcie oceniono zależności genotypów badanych miejsc restrykcyjnych i skuteczności zapłodnienia pozaustrojowego metodą konwencjonalnego IVF (grupa A) i ICSI (grupa B), dzieląc populację na podgrupy z dokonanym i nie dokonanym zapłodnieniem w co najmniej jednej komórce jajowej. Wyniki analiz przedstawiono w tabeli 5.11.

Tabela 5.11. Ocena związku poszczególnych genotypów miejsca restrykcyjnego *AluI*, *RsaI* oraz *AlwMI* z parametrami nasienia oraz skutecznością zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF oraz ICSI

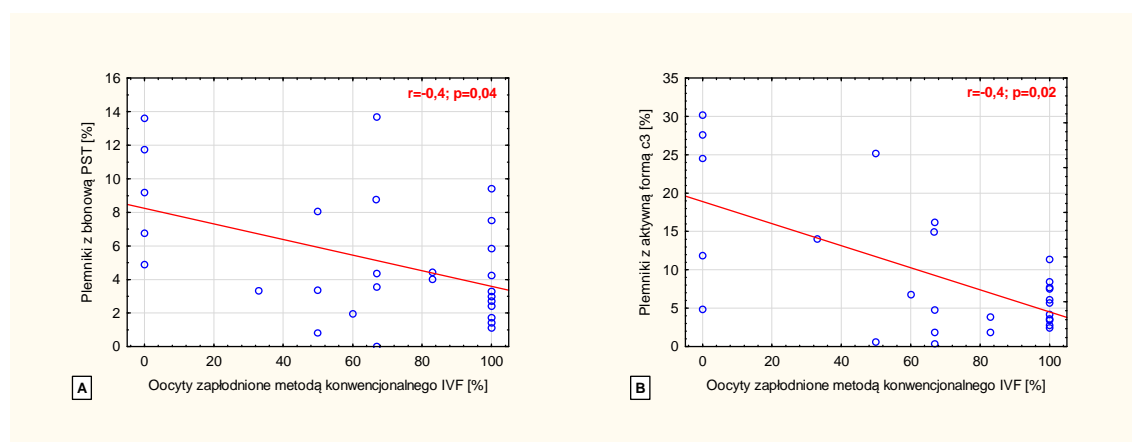
Miejsce restrykcyjne	<i>AluI</i>				<i>RsaI</i>				<i>AlwMI</i>					
	n	AA	AG	GG	p	n	GG	GA	p	n	CC	CT	TT	p
Koncentracja < 15 mln/ml	92	3	13	15	1**	87	26	5	0,13**	96	23	13	0	0,21**
Koncentracja ≥ 15 mln/ml		5	26	30			53	3			41	15	4	
Ruchliwość ruchem postępowym < 32 %	92	6	28	37	0,49**	87	60	7	0,68**	96	49	23	2	0,36**
Ruchliwość ruchem postępowym ≥ 32 %		2	11	8			19	1			15	5	2	
Prawidłowa morfologia < 4 %	92	2	11	18	0,54**	87	23	5	0,11**	96	19	14	0	0,06**
Prawidłowa morfologia ≥ 4 %		6	28	27			56	3			45	14	4	
HOS < 58 %	92	5	19	25	0,78**	87	40	6	0,27**	96	35	17	1	0,4**
HOS ≥ 58 %		3	20	20			39	2			29	11	3	
Brak normozoospermii	92	6	28	39	0,21**	87	62	7	1**	96	50	24	2	0,23**
Normozoospermia		2	11	6			17	1			14	4	2	
Grupa A - doszło do zapłodnienia	31	1	11	12	0,64**	30	23	6	1**	30	18	4	2	1**
Grupa A – nie doszło do zapłodnienia		1	3	3			1	0			5	1	0	
Grupa B - doszło do zapłodnienia	61	5	23	28	0,63**	57	46	4	1**	66	36	23	2	0,28**
Grupa B – nie doszło do zapłodnienia		1	2	2			7	0			5	0	0	

A – grupa pacjentów poddanych konwencjonalnemu IVF, B – grupa pacjentów poddanych ICSI, IVF – zapłodnienie pozaustrojowe, ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika; HOS – test hipoosmotyczny; n – liczba pacjentów poddanych analizie; ** - test dokładny Fishera w rozszerzeniu Freemana-Haltona

5.6. Wykładniki apoptozy plemników a skuteczność zapłodnienia pozaustrojowego

Obliczono zależność wykładników apoptozy oraz skuteczności zapłodnienia w grupie A i B.

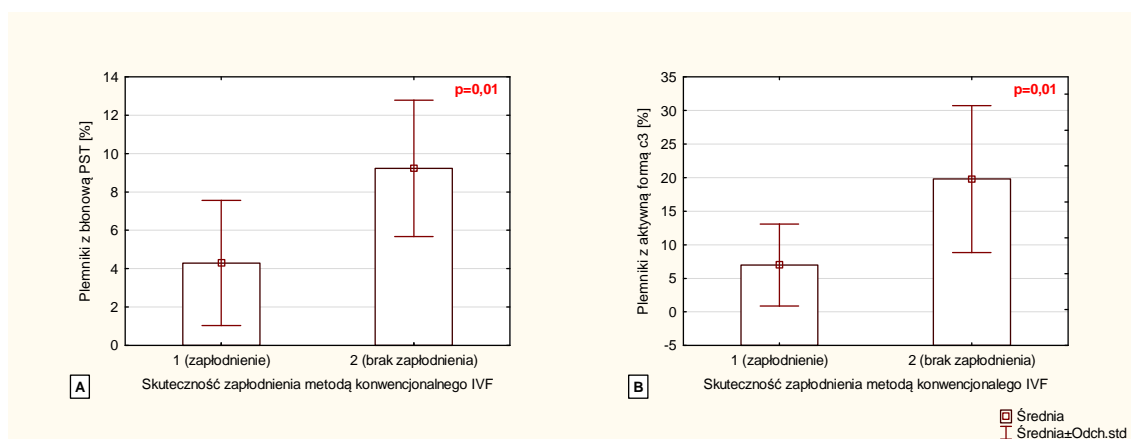
W grupie A zaobserwowano ujemną korelację między odsetkiem oocytów zapłodnionych przy pomocy konwencjonalnego IVF, a odsetkiem plemników z błonową PST ($r=-0,4$, $p=0,04$). Podobnie odsetek komórek jajowych zapłodnionych tą metodą był ujemnie skorelowany z odsetkiem gamet męskich z obecną aktywną formą c3 ($r=-0,4$, $p=0,02$). (Wykres 5.13).



Wykres 5.13. Korelacja odsetka plemników z wykładnikami apoptozy ze skutecznością zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF.

A – Korelacja plemników z błonową PST ze skutecznością konwencjonalnego IVF; B – Korelacja plemników z aktywną formą c3 ze skutecznością konwencjonalnego IVF; IVF – zapłodnienie pozaustrojowe, PST – translokacja fosfatydyloseryny, c3 – kaspaza-3; r – współczynnik korelacji rang Spearmana

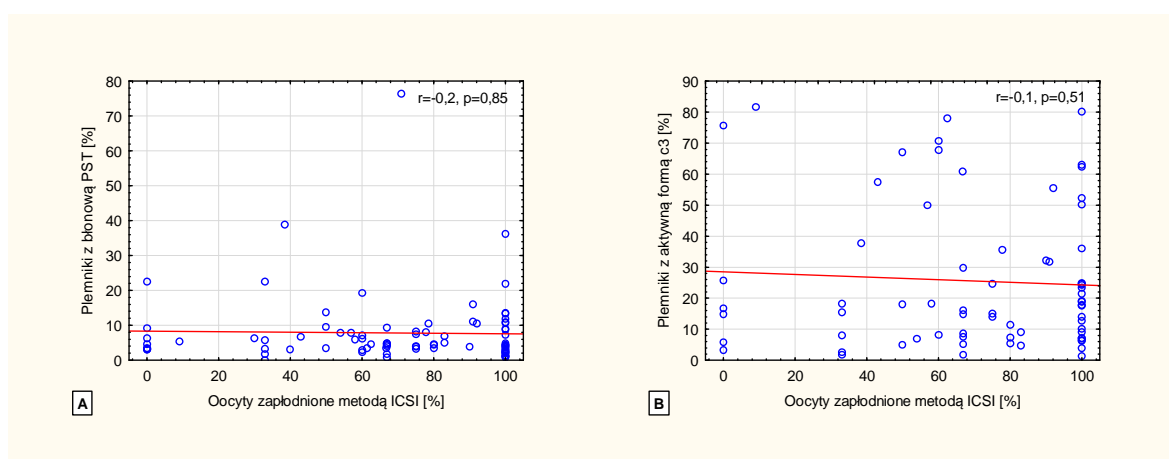
Następnie porównano wykładniki apoptozy w grupie A po podziale na podgrupy: 1 – w której doszło do zapłodnienia w co najmniej jednym oocycie oraz 2 – w której w żadnym oocycie nie stwierdzono obecności przedjądrzy. W grupie 2, w której nie doszło do zapłodnienia zauważono istotnie wyższy odsetek plemników z wykładnikami apoptozy zarówno dla gamet z błonową PST ($p<0,05$), jak i dla gamet z aktywną formą c3 ($p<0,05$). Wyniki zilustrowano na wykresie 5.14.



Wykres 5.14. Porównanie obecności wykładników apoptozy w plemnikach męskich w zależności od skuteczności zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF (test U Manna-Whitneya).

A – Porównanie odsetka plemników z błoną PST między grupami z dokonanym zapłodnieniem (1) oraz z brakiem zapłodnienia (2); B - Porównanie odsetka plemników z aktywną formą c3 między grupami z dokonanym zapłodnieniem (1) oraz z brakiem zapłodnienia (2); PST – translokacja fosfatydyloseryny; c3 – kaspaza-3; IVF – zapłodnienie pozaustrojowe

Podobną analizę przeprowadzono w grupie B. W przypadku oocytów zapładnianych przy pomocy ICSI nie stwierdzono korelacji skuteczności zapłodnienia z wykładnikami apoptozy plemników ani w zakresie błonowej PST ani w zakresie aktywnej formy c3 (odpowiednio $r=-0,2$, $p=0,85$ i $r=-0,1$, $p=0,51$). Analizę zilustrowano na wykresie 5.15.

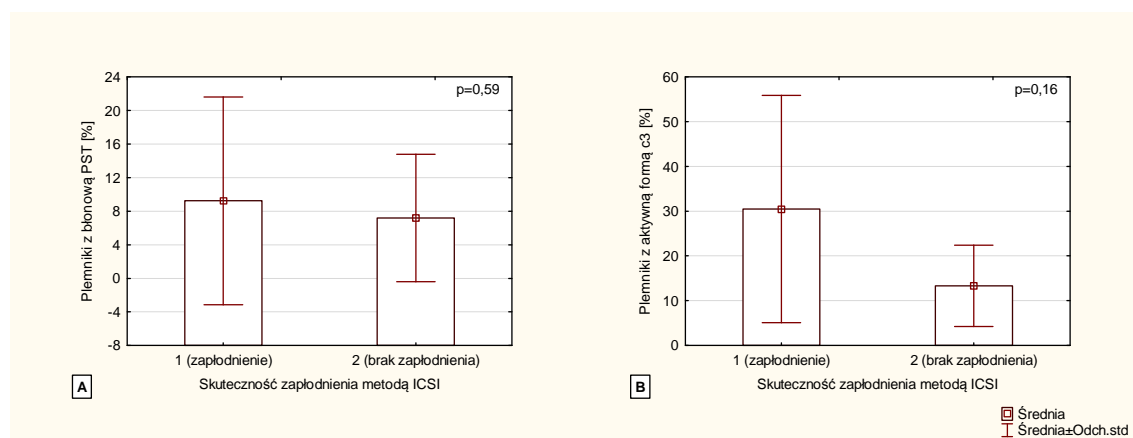


Wykres 5.15. Korelacja odsetka plemników z wykładnikami apoptozy ze skutecznością zapłodnienia metodą ICSI.

A – Korelacja plemników z błoną PST ze skutecznością ICSI; B – Korelacja plemników z aktywną formą c3 ze skutecznością ICSI; ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika, PST – translokacja fosfatydyloseryny, c3 – kaspaza-3; r – współczynnik korelacji rang Spearmana

W grupie B oceniono również występowanie wykładników apoptozy w grupie w której doszło do zapłodnienia co najmniej w jednym oocycie (1) oraz w grupie z nie dokonanym zapłodnieniem (2). Tak jak w przypadku korelacji wykładników apoptozy i skuteczności zapłodnienia, nie uzyskano istotnej statystycznie różnicy między

podgrupami 1 i 2 ani w zakresie obecności w gametach błonowej PST, ani aktywnej formy c3 (odpowiednio $p=0,59$ i $p=0,16$). (Wykres 5.16.)



Wykres 5.16. Porównanie obecności wykładników apoptozy w plemnikach męskich w zależności od skuteczności zapłodnienia metodą ICSI (test U Manna-Whitneya).

A – Porównanie odsetka plemników z błonową PST między grupami z dokonanym zapłodnieniem (1) oraz z brakiem zapłodnienia (2); B - Porównanie odsetka plemników z aktywną formą c3 między grupami z dokonanym zapłodnieniem (1) oraz z brakiem zapłodnienia (2); PST – błonowa translokacja fosfatydyloseryny; c3 – kaspaza-3; ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja pojedynczego plemnika

6. Dyskusja

6.1. Założenia i metodyka pracy

Obniżenie męskiego potencjału zapładniającego może wynikać z wielu czynników (Niedziela i wsp., 2012; Aitken i wsp., 2013b). Jednak w świetle rosnącej ilości doniesień dotyczących rozległej roli jaką w męskim układzie rozrodczym pełnią estrogeny, badanie ich związku z męską płodnością nabiera coraz większego znaczenia. Aby uzyskać swoje biologiczne działanie, estrogeny wchodzi w reakcję ze swoistymi receptorami estrogenowymi. Ich funkcja w męskim układzie rozrodczym jest w ostatnich latach przedmiotem coraz szerszych badań, szczególnie po stwierdzeniu, że myszy płci męskiej pozbawione ESR1 są niepłodne. Udowodniono na modelu zwierzęcym, że estrogeny regulują co najmniej dwa etapy spermatogenezy (na poziomie ilości komórek germinalnych oraz dojrzewania spermatyd) (Carreau i wsp., 2002). Pobrane z najądrza myszy α ERKO plemniki wykazują silnie obniżoną ruchliwość, choć ich struktura nie jest uszkodzona (Lubahn i wsp., 1993; Hess i wsp., 1997). Produkcja estrogenów u ssaków zachodzi głównie w komórkach Leydiga i w komórkach gametogenicznych, choć w okresie rozwoju ich podstawowym źródłem są komórki Sertoliego (Nitta i wsp., 1993; Carreau i wsp., 2011a). U mężczyzny, obecność aromatazy P450 stwierdzono w komórkach nabłonkowych przewodów wyprowadzających oraz w głowie najądrza. Wykazano jej ekspresję także w plemnikach męskich, co sugeruje, że one same mogą produkować estrogeny, pełniąc rolę „ruchomych jednostek endokrynych” (Lambard i wsp., 2005). Obecność receptorów estrogenowych u ludzi stwierdzono w niemal całym MUR, a ich ekspresja zmienia się wraz z etapem rozwoju poszczególnych narządów. Estrogeny odgrywają więc prawdopodobnie bardzo istotną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu męskiego układu rozrodczego. Postuluje się także, że prawidłowa transdukcja sygnału estrogenowego

poprzez receptory jest kluczowa dla optymalnego działania tych hormonów na tkanki docelowe.

Badania na modelach zwierzęcych pozbawionych receptorów estrogenowych potwierdziły dużą rolę estrogenów w MUR. W toku dalszych badań w obrębie genów kodujących ESR stwierdzono występowanie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów. Z polimorfizmami, będącymi wariantami budowy genów, może być związana odmienna funkcja genu i kodowanego przez niego produktu w zależności od występującego w danym miejscu restrykcyjnym genotypu. W przypadku receptorów estrogenowych w MUR, może to skutkować zaburzeniami prowadzącymi do obniżenia płodności.

Apoptoza plemników może wpływać na jakość nasienia, choć dane dotyczące parametrów seminologicznych, na które rzutuje, są kontrowersyjne (Ricci i wsp., 2002; Weng i wsp., 2002; Grunewald i wsp., 2009c; Aitken i wsp., 2010b; Aitken i wsp., 2011a; Kotwicka i wsp., 2011b). Na podstawie modelu zwierzęcego podejrzewa się, że podwyższony odsetek wykładników apoptozy w gametach męskich jest związany z obniżoną zdolnością plemnika do penetracji komórki jajowej (Grunewald i wsp., 2008). Wykładniki apoptozy plemników potraktowano w niniejszym opracowaniu jako element opisujący funkcję gamet. Z tego względu zaangażowano ocenę błonowej PST i aktywnej formy c3 zarówno do badań związku z występowaniem polimorfizmów genów *ESR1* i *ESR2*, jak również do analizy funkcji zapładniającej męskich komórek rozrodczych.

W prezentowanej pracy podjęto próbę oceny potencjalnego związku polimorfizmów genów kodujących receptory estrogenowe oraz apoptozy plemników z parametrami określającymi zdolność zapładniającą gamety męskiej. W badaniu genu *ESR1* zdecydowano się na wykorzystanie miejsc restrykcyjnych *XbaI* i *PvuII*. Zgodnie z danymi w dostępnej literaturze, polimorfizmy tych miejsc restrykcyjnych są najczęściej podawane jako te, które mogą brać udział w ewentualnym zaburzeniu transdukcji sygnału estrogenowego w *ESR1* i rzutować na męską płodność (Solakidi i wsp., 2005; Lazaros i wsp., 2008; Lazaros i wsp., 2010). W przypadku *ESR2* podjęto próbę oceny funkcji zapładniającej gamety męskiej w zależności od polimorfizmów miejsc restrykcyjnych *AluI*, *RsaI* oraz *AlwNI*. Pierwsze dwa zostały już opisane w literaturze w kontekście płodności męskiej, zaś miejsce restrykcyjne *AlwNI* badano pod tym kątem po raz pierwszy na potrzeby niniejszego opracowania (Khattri i wsp., 2009a; Khattri i wsp., 2009b; Safarinejad i wsp., 2010; Ogata i wsp., 2012).

Obok badania polimorfizmów wybranych miejsc restrykcyjnych *ESR1* i *ESR2* zastosowano szereg metod pozwalających na ocenę parametrów określających zdolność zapładniającą plemników męskich. W pierwszej kolejności przeprowadzono standardową ocenę seminologiczną. Zgodnie z dostępną literaturą, parametry nasienia takie jak koncentracja, ruchliwość, morfologia i żywotność gamet męskich mają najwyższą wartość predykcyjną dla określenia szansy na uzyskanie spontanicznego zapłodnienia (Jędrzejczak i wsp., 2008). Parametry te badane są według rekomendacji Światowej Organizacji Zdrowia, a prowadzone w laboratorium seminologicznym zewnętrzne i wewnętrzne kontrole jakości pozwalają na uzyskanie maksymalnej obiektywizacji i wiarygodności wyników (Jędrzejczak i wsp., 2012). Jednak prezentowane tutaj wyniki analiz badanej populacji nie w pełni potwierdzają właściwości predykcyjne wymienionych parametrów nasienia, pomimo przyjęcia modelu konwencjonalnego IVF jako rodzaju odzwierciedlenia funkcji gamety męskiej zbliżonej do naturalnego poczęcia. Zarówno w grupie leczonej przy pomocy konwencjonalnego IVF (grupa A) jak i ICSI (grupa B) wydzielono dwie podgrupy – (1), w której doszło do zapłodnienia (a więc obserwowano przedjądrza) w co najmniej jednym oocyte i (2), w której żaden z oocytów nie został zapłodniony. Zaobserwowano, że w grupie A nie było istotnych statystycznie różnic w zakresie średniej koncentracji, ruchliwości ruchem postępowym, ani prawidłowej morfologii plemników między podgrupami 1 i 2, a więc w grupie tej na podstawie średnich parametrów nasienia nie można przewidzieć wyniku zapłodnienia. Odmiennie sytuacja ta wygląda w przypadku żywotności plemników mierzonej przy pomocy HOS oraz wykładników apoptozy plemników. Zarówno w przypadku HOS jak i plemników z błonową PST oraz z aktywną formą c3, w grupie A można obserwować istotne statystycznie różnice między podgrupami z dokonanym i niedokonanym zapłodnieniem. Większa żywotność plemników wiąże się z większą szansą na zapłodnienie, zaś wyższe odsetki badanych wykładników apoptozy tę szansę zmniejszają. W przypadku nasienia wykorzystanego do ICSI, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie żadnego z badanych parametrów. W świetle wyników prezentowanych w tej pracy badań, największy związek z wynikiem zapłodnienia ma żywotność plemników oraz nasilona apoptoza gamet. Różnice w wynikach w stosunku do cytowanej pracy mogą wynikać z kilku czynników. Jędrzejczak i wsp. oceniali wartość predykcyjną parametrów nasienia dla spontanicznego poczęcia, zaś prezentowane tutaj wyniki odniesione są do zapłodnienia w warunkach *in vitro*. Ponadto badacze ci zastosowali

skomplikowany model regresji logistycznej i operowali na większej i bardziej proporcjonalnej grupie badanych mężczyzn (113 pacjentów o prawidłowych parametrach nasienia i 109 o nieprawidłowych, w porównaniu do analizowanych w tej pracy 28 mężczyzn z normozoospermią i 88 z obniżonymi parametrami). Wreszcie w cytowanej pracy posługiwano się rekomendacjami WHO z 1999 roku i nie badano wykładników apoptozy plemników (WHO, 1999). Wynikiem powtarzalnym, właściwym dla plemników o większej zdolności zapładniającej, pozostaje wysoka żywotność plemników.

W celu oceny zdolności zapładniającej gamet w niniejszej pracy wykorzystano dwa modele zapłodnienia pozaustrojowego – konwencjonalne IVF (grupa A) i ICSI (grupa B). Kwalifikacja do odpowiedniej techniki IVF prowadzona jest standardowo na podstawie parametrów nasienia. Do zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF kwalifikowani są pacjenci z lepszymi parametrami nasienia niż do grupy, w której przeprowadza się ICSI (Jędrzejczak i wsp., 2005). Jest to również widoczne w prezentowanych w tej pracy wynikach – w porównaniu grup A i B zarówno w przypadku koncentracji nasienia, jak i jego ruchliwości ruchem postępowym, prawidłowej morfologii i żywotności średnie parametry są istotnie statystycznie lepsze w grupie zapładnianej metodą konwencjonalnego IVF. Jednak nie bez znaczenia dla oceny związku wykładników apoptozy z potencjałem zapładniającym gamety męskiej jest fakt, że choć w grupie A parametry nasienia były lepsze niż w grupie B, to jednak między obydwoma grupami nie wystąpiła różnica statystyczna w wykładnikach apoptozy gamet ($p > 0,05$).

Konwencjonalne IVF odpowiada w dużym stopniu zapłodnieniu w warunkach naturalnych. Tak jak przy zapłodnieniu naturalnym, w mechanizmie konwencjonalnego IVF dochodzi do wszystkich etapów koniecznych do fuzji plemnika z komórką jajową i połączenia matczynego i ojcowskiego DNA: ma miejsce reakcja kapacytacji, rozpoznanie, reakcja akrosomalna i wreszcie penetracja oolemy. Wydaje się, iż w modelu konwencjonalnego IVF, w którym dochodzi do zapłodnienia oocytu, gamety męskie mają prawidłową lub zbliżoną do prawidłowej zdolność zapładniającą. W przypadku drugiego modelu, ICSI, pewne etapy zapłodnienia nie są niezbędne do wnikięcia plemnika do oocytu. Nie jest konieczne właściwe rozpoznanie, fuzja ani penetracja błony komórkowej komórki jajowej, gdyż elementy te są pominięte podczas procedury laboratoryjnej polegającej na iniekcji plemnika do wnętrza dojrzałej gamety

żeńskiej. Skuteczność ICSI jest stosunkowo wysoka nawet w przypadku słabych parametrów nasienia (Sariibrahim i wsp., 2013; Xie i wsp., 2013).

W prezentowanych wynikach, w celu stwierdzenia obiektywności badań porównujących grupy A i B, obliczono średnie parametry takie jak wiek partnera i partnerki, liczbę oocytów wykorzystanych do procedury zapłodnienia pozaustrojowego oraz odsetek zapłodnionych komórek jajowych w obu grupach. Porównano wyniki między grupami. Nie uzyskano różnicy wieku partnerek ani partnerów. Założyć można, że skuteczność zapłodnień mierzona obecnością przedjądrzy w oocytach 16 do 18 godzin po przeprowadzeniu procedury zapłodnienia pozaustrojowego zależna była przede wszystkim od funkcji plemników, nie zaś od czynnika potencjalnie najsilniej rzutującego na wynik zapłodnienia pozaustrojowego, jakim jest wiek partnerki od której pobrano komórki jajowe (Mol i wsp., 2000; Suchartwatnachai i wsp., 2000; Jansen 2003; Jędrzejczak i wsp., 2005). Choć do procedury konwencjonalnego IVF wykorzystano średnio mniej oocytów niż do ICSI, to jednak przekrojowy odsetek zapłodnionych komórek jajowych w obu grupach był podobny ($p > 0,05$). Z tego względu można przyjąć charakterystykę obu grup za porównywalną.

Podstawą oceny zdolności zapładniającej gamet męskich była obecność prawidłowych przedjądrzy w poddanych procedurze zapłodnienia pozaustrojowego komórkach jajowych. W dostępnej literaturze dotyczącej klasyfikacji męskiego potencjału zapładniającego znaleźć można opracowania potwierdzające słuszność przyjętego założenia (Vawda i wsp., 1996; Donnelly i wsp., 1998; Jędrzejczak i wsp., 2005). Równocześnie zrozumiała wydaje się interpretacja braku przedjądrzy jako niemożności zapłodnienia oocytu.

Zalecanym w literaturze, optymalnym sposobem oceny wykładników apoptozy komórek jest badanie co najmniej dwóch markerów apoptozy w danej populacji (Elmore, 2007). Badanymi na potrzeby niniejszej pracy wykładnikami apoptozy plemników były: błonowa translokacja fosfatydyloseryny oraz obecność aktywnej formy kaspazy-3. Obecność błonowej PST świadczy o wczesnym etapie programowanej śmierci komórki, zaś obecność aktywnej formy c3 – o etapie późnym. Wybrane wykładniki apoptozy pozwalają więc na szeroką ocenę aktywności procesu obumierania gamet męskich. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż interpretacja wyników badania apoptozy komórek budzi pewne kontrowersje. Apoptoza bierze bowiem udział w homeostazie spermatogenezy, jej wykładniki mogą więc być obecne

w komórkach niedojrzałych i nie można jednoznacznie stwierdzić, czy pojawiły się tam przed czy po ejakulacji (Weng i wsp., 2002; Aitken i wsp., 2011a).

Badanie wykładników apoptozy komórek przy pomocy cytometrii przepływowej uwidacznia cztery ich frakcje. Dla pewnego uproszczenia przyjęto interpretację sumy frakcji komórek prezentujących fluorescencję aneksyny-V jako komórek z obecną błonową PST. Także w przypadku znakowania plemników z aktywną formą c3, jako gamety z tym markerem apoptozy przyjęto sumę plemników wykazujących fluorescencję. Jest to uznany w literaturze sposób interpretacji wyników cytometrii przepływowej w ocenie komórek z wykładnikami apoptozy, dający możliwość potencjalnego porównania wyników z wynikami uzyskanymi innymi metodami, na przykład w badaniu błonowego potencjału mitochondrialnego plemników (MMP; ang. *mitochondrial membrane potential*) (Weng i wsp., 2002; Zorn i wsp., 2012). Uzyskana w niniejszej pracy silna korelacja występowania błonowej PST i aktywnej formy c3 ($r=0,6$, $p<0,001$) świadczy o poprawnej metodologii badania i interpretacji wyników markerów apoptozy plemników.

6.2. Polimorfizmy miejsc restrykcyjnych *PvuII* i *XbaI* genu *ESR1* oraz *AluI*, *RsaI* i *AlwNI* genu *ESR2* – omówienie wyników w zakresie parametrów nasienia

Choć wzrasta w ostatnich latach zainteresowanie problematyką zaburzeń transdukcji sygnału estrogenów mogących wynikać z polimorfizmów genetycznych genów kodujących receptory estrogenowe, to jednak istnieje jak dotąd niewiele prac badających bezpośredni związek tych polimorfizmów z parametrami nasienia i zdolnością zapładniającą plemników męskich. W dostępnych pracach wyniki także nie są jednoznaczne. Może to wynikać na przykład z różnic etnicznych badanych populacji. Zróżnicowanie etniczne zależności cech od SNP zaobserwować można także analizując na przykład badania dotyczące związku SNP genów kodujących receptory estrogenowe i występowania osteoporozy (Kim i wsp., 2001; Lau i wsp., 2001; Taguchi i wsp., 2003, Janusz i wsp., 2013).

Zarówno genotypy badanych miejsc restrykcyjnych *ESR1* jak i *ESR2* prezentują rozkład zgodny z równowagą Hardy-Weinberga, pomimo tego, że grupa pacjentów jest wyselekcjonowaną populacją leczoną przy pomocy zapłodnienia pozaustrojowego. Zwraca uwagę fakt, że w przypadku *RsaI* nie uzyskano genotypu AA u żadnego pacjenta. Jest to jednak zgodne z danymi literaturowymi – genotyp ten był oznaczany

zdecydowanie najrzadziej bez względu na populację badanych mężczyzn (Khattri i wsp., 2009a; Lazaros i wsp., 2010; Zhang i wsp., 2011).

Przy interpretacji rozkładu genotypów poszczególnych miejsc restrykcyjnych warto zwrócić uwagę, że do badania zakwalifikowano wyselekcjonowaną grupę mężczyzn, z której większość miała obniżone parametry nasienia. Jedynie 24% pacjentów w badanej populacji miało normozoospermie w zakresie ruchliwości ruchem postępowym, koncentracji i prawidłowej morfologii, przy czym nie u wszystkich pacjentów z normozoospermia skuteczną była izolacja DNA niezbędna do dalszych badań polimorfizmów wybranych miejsc restrykcyjnych.

W przypadku oceny związku parametrów nasienia z polimorfizmami genów *ESR1* i *ESR2* zaproponowano porównanie ich średnich wartości lub median (w zależności od normalności rozkładu) w obrębie poszczególnych genotypów badanych miejsc restrykcyjnych.

Zarówno Rago i wsp., jak i Aquila i wsp. prezentowali wyniki immunolokalizacji *ESR1* w okolicy wstawki. Badania Solakidiego i wsp., Aquila i wsp. oraz Rago i wsp. lokalizują w tej okolicy także *ESR2* (Aquila i wsp., 2004; Solakidi i wsp., 2005, Rago i wsp., 2006). Sugeruje się więc, że istnieje możliwość obecności tych receptorów w mitochondriach plemników, co mogłoby być związane z różną ruchliwością tych komórek w zależności od wariantu budowy genu kodującego receptory. Jednak prezentowane w tej pracy wyniki nie potwierdziły tego typu zależności. W badaniu polimorfizmów *ESR1* ruchliwość plemników, zarówno w przypadku *PvuII* jak i *XbaI*, nie różniła się istotnie między genotypami. Także w przypadku polimorfizmów *ESR2* w prezentowanych wynikach nie obserwowano związku ruchliwości postępowej gamet z żadnym z genotypów poddanych analizie miejsc restrykcyjnych. Może to być związane ze stosunkowo niewielką populacją badanych. Ponadto normozoospermia, po izolacji DNA, występowała jedynie u 23 pacjentów czyli 22% grupy badanej dla *PvuI* i *XbaI*, u 19 pacjentów czyli 21% badanych przypadku *AluI*, w przypadku *RsaI* – u 18 mężczyzn czyli 21%. W przypadku *AlwNI* było to 20 chorych czyli 21% populacji badanej. Może to tłumaczyć obserwacje odmienne od tych prezentowanych przez grupę Lazaros i wsp. (Lazaros i wsp., 2010). Badacze ci stwierdzili bowiem związek genotypu GG *AluI* z wyższą ruchliwością gamet w porównaniu z genotypami AG i AA, jednak w badanej przez nich populacji 114 mężczyzn aż 85 miało normozoospermie. Nie można jednak także wykluczyć, że ze względu na postulowane dla plemników niegenomowe działanie receptorów

estrogenowych zaburzenia ich struktury w obrębie badanych miejsc restrykcyjnych nie mają związku z funkcją mitochondriów i z ruchliwością gamet.

W toku analiz miejsc restrykcyjnych *PvuII* i *XbaI* genu *ESR1* stwierdzono także, że koncentracja, morfologia i żywotność plemników nie różniły się między poszczególnymi genotypami w obrębie żadnego z tych miejsc restrykcyjnych. Nie znaleziono zatem w badanej populacji związku polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 z parametrami nasienia.

Także w przypadku analizy miejsc restrykcyjnych *AluI*, *RsaI* i *AlwNI* genu *ESR2* nie zauważono związku żadnego z genotypów z koncentracją, morfologią i żywotnością gamet. W badaniu *AluI*, wysokie wartości $p=0,94$, $p=0,69$ i $p=0,72$ odpowiednio dla porównania koncentracji, morfologii i żywotności plemników pomiędzy poszczególnymi genotypami wskazują dość jednoznacznie na brak różnic w wartościach tych parametrów w zależności od genotypu. Prezentacja graficzna wyników koncentracji, ruchliwości i morfologii plemników wskazuje na lepsze wartości tych parametrów w obrębie genotypu TT *AlwNI*, jednak nie ma w tym zakresie istotności statystycznej (odpowiednio $p=0,1$, $p=0,12$ i $p=0,31$ dla koncentracji, ruchliwości ruchem postępowym i morfologii). W przypadku *RsaI* zaobserwowano nieco lepsze parametry nasienia dla genotypu GG, jednak w przypadku żadnego parametru nie uzyskano różnicy istotnej statystycznie. Być może w przypadku kontynuacji badania na większej populacji chorych lub przy wyselekcjonowaniu większej grupy pacjentów mających prawidłowe parametry nasienia możliwa będzie obserwacja silniejszej tendencji przewagi tego genotypu w grupie pacjentów z lepszymi parametrami nasienia. W populacji badanej prezentowanej w tej pracy nie dowiedziono jednak związku polimorfizmów *ESR2* z żadnym z parametrów seminologicznych.

W następnym etapie analiz podzielono grupę badaną po kolei pod względem koncentracji, ruchliwości ruchem postępowym, prawidłowej morfologii i żywotności plemników na dwie grupy – odpowiednio o wymienionych parametrach w zakresie wartości referencyjnych WHO z 2010 roku oraz poniżej wartości referencyjnych (WHO, 2010). Przy pomocy testu χ^2 oraz testu dokładnego Fishera zbadano, czy któryś z badanych genotypów miejsc restrykcyjnych jest związany z występowaniem podstawowych parametrów nasienia w prawidłowym zakresie.

Dla *ESR1* nie zauważono przewagi któregośkolwiek z genotypów *PvuII* ani *XbaI* dla żadnego z parametrów nasienia. Oznacza to, że w badanej populacji prawidłowe parametry nasienia albo oligozoospermia, asthenozoospermia czy teratozoospermia nie

były związane z polimorfizmami *PvuII* i *XbaI*. Nie zauważono także związku badanych parametrów seminologicznych z żadnym z genotypów analizowanych miejsc restrykcyjnych *ESR2*. Jedyne w przypadku *AluNI* genotyp CC jest dominujący wśród chorych z prawidłową morfologią plemników $\geq 4\%$, jednak wynik ten nie jest poparty istotnością statystyczną ($p=0,06$).

Ponadto podjęto próbę analizy rozkładu genotypów po wydzieleniu pacjentów z normozoospermią w zakresie koncentracji, ruchliwości ruchem postępowym i prawidłowej morfologii plemników. Miało to na celu sprawdzenie, czy którykolwiek z genotypów będzie dominujący w grupie z normozoospermią w porównaniu z pacjentami o nieprawidłowych parametrach nasienia. Nie stwierdzono jednak istotnej statystycznie różnicy zarówno dla miejsc restrykcyjnych *ESR1* jak i *ESR2*, co oznacza, że w badanej populacji żaden z genotypów nie był związany z występowaniem u pacjentów normozoospermii.

Prezentowane wyniki są częściowo zgodne z tymi opublikowanymi przez Lazaros i wsp. (Lazaros i wsp., 2010). Badacze ci w swej pracy z 2010 roku analizowali rozkład genotypów osobno w grupie z prawidłową koncentracją i prawidłową ruchliwością plemników, a następnie z oligozoospermią i asthenozoospermią. Stwierdzili brak związku polimorfizmów *PvuII* i *XbaI* genu *ESR1* z ruchliwością nasienia w grupie pacjentów z prawidłową kinetyką plemników. Zauważyli oni jednak, że w grupie z asthenozoospermią genotypy CC i TC były związane z lepszą ruchliwością gamet niż genotyp nie zawierający cytozyny, czyli TT. Również w przypadku *XbaI* w populacji o obniżonej ruchliwości gamet przez Lazaros i wsp. lepszą ruchliwość plemników wykazano u pacjentów z genotypami AG i GG niż w przypadku AA. W analizie koncentracji nasienia i jej związku z genotypami *PvuII* i *XbaI*, w grupie z prawidłową koncentracją plemników, Lazaros i wsp. zauważyli, że genotypowi TT *PvuII* towarzyszy większa ilość plemników niż pozostałym genotypom. Dla *XbaI*, wyższa koncentracja nasienia obserwowana była w przypadku genotypu AA niż AG i GG. Wśród pacjentów z asthenozoospermią nie zauważono podobnych zależności. Przy badaniu *ESR2* badacze ci stwierdzili, przeciwnie niż w prezentowanych tutaj wynikach, wyższe wartości ruchliwości plemników ruchem postępowym u pacjentów z genotypem GG *AluI*. Równocześnie podobnie jak w niniejszej pracy nie zaobserwowano związku koncentracji plemników z *AluI*, ani żadnych różnic w parametrach nasienia między poszczególnymi genotypami *RsaI*. Rozbieżności wyników są dość trudne do interpretacji. Choć wielkość grup badanych była

porównywalna (114 pacjentów w publikacji Lazaros i wsp., DNA wyizolowane od 102 pacjentów w prezentowanej pracy), to jednak Lazaros i wsp. odnosili się do norm WHO z 1999 roku, gdzie diagnozę oligozoospermii stawiano gdy koncentracja plemników wynosiła < 20 mln/ml, zaś asthenozoospermii – gdy ruchliwość gamet ruchem postępowym oceniana była na $< 50\%$ (WHO, 1999). Ponadto różnica wyników może mieć przyczynę w różnym tle etnicznym tych grup. Pochodzenie pacjentów w grupie badanej jest istotnym czynnikiem mogącym wpływać na dystrybucję polimorfizmów.

6.3. Polimorfizmy miejsc restrykcyjnych *PvuII* i *XbaI* genu *ESR1* oraz *AluI*, *RsaI* i *AlwNI* genu *ESR2* – omówienie wyników w zakresie skuteczności zapłodnienia

Solakidi i wsp. wskazują lokalizację ESR1 w segmencie równikowym główki plemnika. Sugerują wynikające stąd możliwe zaangażowanie tego receptora w procesie połączenia błony komórkowej gamet męskiej i żeńskiej (Solakidi i wsp., 2005). Wydaje się więc, że poszczególne polimorfizmy genu kodującego ESR1 u mężczyzn mogłyby być związane z różnym odsetkiem zapłodnionych komórek jajowych u ich partnerek. Na potrzeby prezentowanej pracy przeprowadzono więc analizę danych pod tym kątem.

W obrębie miejsca restrykcyjnego *PvuII*, nie stwierdzono różnic między skutecznością zapłodnienia pozaustrojowego bez względu na genotyp, zarówno w przypadku konwencjonalnego IVF jak i ICSI. Jednak, choć porównanie procentowej skuteczności obu metod zapłodnienia pomiędzy genotypami daje wynik $p > 0,05$, to można na wykresie 5.5 zaobserwować pewną tendencję dla genotypu CC i konwencjonalnego IVF – w tym wariancie skuteczność tej metody wydaje się być nieco niższa, niż w przypadku wariantów TT i TC (jednak $p = 0,16$). Podobnych zależności nie zaobserwowano w przypadku ICSI, gdzie średnia skuteczność zapłodnienia była porównywalna bez względu na genotyp i $p = 0,75$.

W przypadku miejsca restrykcyjnego *XbaI* badania porównujące skuteczność konwencjonalnego IVF oraz ICSI nie wykazały żadnych różnic. W grupie A $p = 0,73$, zaś w grupie B $p = 0,97$ praktycznie wyklucza w populacji badanej związek polimorfizmów miejsca restrykcyjnego *XbaI* ze skutecznością zapłodnienia którąkolwiek ze stosowanych metod zapłodnienia pozaustrojowego.

Z uwagi na lokalizację ESR2 w okolicy wstawki i postulowany w związku z tym udział estrogenów w procesie zapłodnienia, podjęto także próbę analizy relacji

polimorfizmów *ESR2* z wynikami zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF i ICSI. W przypadku *AluI* nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności poszczególnych genotypów ze skutecznością zapłodnienia żadną z metod. W przypadku konwencjonalnego IVF zauważyć można tendencję w kierunku nieco niższego odsetka zapłodnionych komórek jajowych dla genotypu AA, choć $p=0,25$. Wyniki te nie pokrywają się z wynikami zespołu Aschim i wsp. (Aschim i wsp., 2005). Badacze ci zauważyli, że u niepłodnych mężczyzn genotyp AA występował najrzadziej, choć także nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych między genotypami. Ponieważ jednak w cytowanej pracy zastosowano inne kryterium niepłodności męskiej (koncentracja plemników < 5 mln/ml i brak badania partnerki) wyniki są trudne do porównania. W niniejszej pracy nie zaobserwowano tendencji dominacji któregoś z genotypów *AluI* u pacjentów leczonych przy pomocy ICSI w kontekście skuteczności tej metody. Z pewną ostrożnością można więc wysunąć przypuszczenie, że o ile polimorfizmy genów receptora estrogenowego 1 i 2 mogą mieć związek ze skutecznością konwencjonalnego IVF (i być może naturalnej koncepcji), o tyle w warunkach ICSI pozostają bez wpływu na jego wynik.

W ocenie *AlwNI* nie zauważono różnic między genotypami w zakresie skuteczności zapłodnienia żadną z metod zapłodnienia pozaustrojowego. Genotypy *RsaI* i skuteczność IVF ze względu na brak chorych z genotypem AA i małą liczebność grupy z genotypem GA analizowano tylko testem χ^2 porównując pacjentów, u których doszło do zapłodnienia co najmniej jednego oocytu oraz pacjentów u których nie została zapłodniona żadna komórka jajowa. Nie stwierdzono zależności żadnego z genotypów z wynikiem zapłodnienia ani w grupie A, ani w grupie B. Badanie tego polimorfizmu w kontekście skuteczności zapłodnienia prowadził na populacji chińskiej także zespół Zhang i wsp. (Zhang i wsp., 2011). Badacze ci zaobserwowali występowanie genotypu AA u 32 z 865 mężczyzn i zaobserwowali, że choć nie było między genotypami różnicy w skuteczności zapłodnienia, to właśnie genotyp AA wiązał się w dalszym etapie obserwacji z gorszą jakością zarodków. Wyniki te zachęcają do dalszych badań w tym kierunku również na populacji kaukaskiej.

Oceniono rozkład genotypów pozostałych badanych miejsc restrykcyjnych *ESR1* i *ESR2* w grupie A i B w zależności od skuteczności zapłodnienia. W grupie A leczonej przy pomocy konwencjonalnego IVF stwierdzono statystycznie istotną większą częstość występowania genotypu TC miejsca restrykcyjnego *PvuII* w grupie, w której

doszło do zapłodnienia co najmniej jednej komórki jajowej ($p=0,019$). Podobnych zależności nie stwierdzono w przypadku pozostałych genotypów *PvuII*, żadnego z genotypów *XbaI* ani żadnego z genotypów badanych SNP *ESR2*. Jest to więc jedyna istotna statystycznie zależność badanych polimorfizmów receptorów estrogenowych ze skutecznością zapłodnienia stwierdzona w materiale ocenianym na potrzeby tej pracy. Wydaje się więc, że nasuwający się wniosek dotyczący korzystnego związku genotypu TC *PvuII* ze zdolnością zapładniającą nasienia należy traktować z pewną ostrożnością.

6.4. Polimorfizmy miejsc restrykcyjnych *PvuII* i *XbaI* genu *ESR1* oraz *AluI*, *RsaI* i *AlwNI* genu *ESR2* – omówienie wyników w zakresie związku polimorfizmów z wykładnikami apoptozy plemników

Estrogeny w komórkach somatycznych mają wpływ na proliferację i proces apoptozy. Apoptoza plemników jest czynnikiem kontrolującym prawidłowość spermatogenezy, przy czym szacuje się, że nawet ponad 50% komórek gametogenicznych ginie w tym procesie (O'Donnell i wsp., 2001; Tres i wsp., 2004). W badaniach Mishra wykazano, że w 75% komórek spermatogenicznych poddanych działaniu estradiolu dochodziło do błonowej PST, przy zaledwie 12% komórek w grupie kontrolnej (Mishra, 2004). Wyniki te pozwalają podejrzewać, że zaburzenia transdukcji sygnału estrogenowego mogą nasilać apoptozę plemników.

W prezentowanej pracy ocenie poddano występowanie wykładników apoptozy plemników i ich związek z badanymi polimorfizmami genów kodujących receptory estrogenowe 1 i 2. W zakresie *ESR1* nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w średnich odsetkach plemników z błonową PST pomiędzy poszczególnymi genotypami. Także w przypadku plemników z obecną aktywną formą kaspazy-3 nie stwierdzono różnic w ich występowaniu w zależności od genotypu *PvuII* i *XbaI*. Wydaje się więc, że w zaburzenia struktury genu receptora estrogenowego 1 w obrębie badanych miejsc restrykcyjnych nie mają związku z nasileniem apoptozy plemników ludzkich.

W przypadku polimorfizmów *ESR2*, jedynie w przypadku *RsaI* zauważono wyższy odsetek PST u chorych z genotypem GA ($p=0,01$). Ponieważ jednak genotyp ten stwierdzono zaledwie u 8 pacjentów i w przypadku obecności w plemnikach aktywnej formy c3 nie potwierdzono tej zależności, związek między genotypem *RsaI*

a występowaniem nasilonej apoptozy trzeba traktować z pewną ostrożnością. Nie wykluczone jednak, że jak zasugerowano w pracy Zhang i wsp., obecność allelu A sprzyja pogorszeniu parametrów nasienia (Zhang i wsp., 2011). Potwierdzenia tej zależności w populacji kaukaskiej należałoby prawdopodobnie szukać na większej grupie badanych.

6.5. Apoptoza plemników a zdolność zapładniająca gamet męskich

Fluorescencję aneksyny-V oraz markera aktywnej formy kaspazy-3 zauważono, tak jak w badaniach Kotwickiej i wsp., głównie w okolicach wstawki plemników (Kotwicka i wsp., 2011a). Fluorescencja ta była widoczna zarówno w plemnikach ruchliwych, jak i nie poruszających się ruchem postępowym. Wstawka plemnika jest regionem o największym nagromadzeniu odpowiedzialnych za produkcję energii do poruszania się mitochondriów. Można więc podejrzewać, że zwiększone nasilenie apoptozy w tym rejonie korelować może z obniżoną ruchliwością gamet. Wyniki takie prezentowali Weng i wsp. (Weng i wsp., 2002). Barroso i wsp. zaobserwowali obniżenie potencjału mitochondrialnego w plemnikach z błonową PST (Barroso i wsp., 2006). Postulowane obniżenie ruchliwości gamet wraz z nasilającymi się wykładnikami apoptozy znajduje potwierdzenie także w prezentowanych w tej pracy wynikach. Zaobserwowano bowiem zwiększenie odsetka błonowej PST i aktywnej formy kaspazy-3 wraz ze zmniejszeniem ruchliwości plemników ($r=-0,4$ i $p<0,0001$ dla PST oraz $r=-0,6$ i $p<0,0001$ dla aktywnej formy c3).

W prezentowanych wynikach stwierdzono ujemną korelację żywotności plemników z wykładnikami ich apoptozy ($r=-0,3$ i $p<0,001$ dla PST oraz $r=-0,5$ i $p<0,0001$ dla c3). Koresponduje to z wynikami Kotwickiej i wsp. Badacze ci ocenili także korelacje zależność ruchliwości gamet i odsetka plemników z błonową PST. Podobnie jak w wynikach uzyskanych w niniejszej pracy, autorzy ci zaobserwowali silną ujemną korelację błonowej PST z ruchliwością plemników poruszających się ruchem postępowym szybkim (Kotwicka i wsp., 2011b). Stanger i wsp. przedstawili wyniki sugerujące wysoką efektywność testu hipoosmotycznego w wykrywaniu plemników bez fragmentacji materiału genetycznego, a obserwowana w prezentowanych w tej pracy wynikach silna ujemna korelacja wykładników apoptozy z żywotnością gamet wydaje się potwierdzać rolę, jaką badanie apoptozy może

odgrywać w identyfikacji plemników potencjalnie niezdolnych do prawidłowego zapłodnienia komórki jajowej (Stanger i wsp., 2010).

Choć w kilku pracach zaobserwowano, tak jak w uzyskanych tutaj wynikach, negatywną korelację wykładników apoptozy gamet także z koncentracją i morfologią plemników, to jednak nie wszyscy badacze są jednogłośni (Oehninger i wsp., 2003; Marchetti i wsp., 2004; Grunewald i wsp., 2008; Grunewald i wsp., 2009c). Ricci i wsp. na próbie 57 pacjentów nie stwierdzili istotnej statystycznie zależności koncentracji, ruchliwości ani morfologii plemników z błonową PST (Ricci i wsp., 2002). Dopiero po wyselekcjonowaniu pacjentów z normozoospermia badacze ci zaobserwowali, że podwyższony odsetek PST jest związany z obniżeniem koncentracji i morfologii plemników, pozostawał jednak bez wpływu na ich ruchliwość. Rozbieżności uzyskanych przez tych autorów wyników w porównaniu z wynikami prezentowanymi w tej pracy można tłumaczyć mniejszą populacją pacjentów w pracy Ricci i wsp. Być może nie bez znaczenia jest także fakt, że kwalifikację do grupy normozoospermii prowadzono na podstawie rekomendacji WHO z 1999 roku.

W analizie danych badanej na potrzeby tej pracy populacji stwierdzono obecność PST średnio w 8% gamet, zaś aktywnej formy c3 w 26% plemników. Trudno jednoznacznie wyjaśnić dlaczego późny wykładnik apoptozy pojawia się w badanych komórkach częściej niż wczesny, jednak potwierdzeniem prawidłowości metodyki przeprowadzonego badania wydaje się fakt, że obecność PST silnie koreluje z obecnością aktywnej formy c3 ($r=0,6$, $p<0,0001$).

W dalszej części badań podjęto próbę oceny związku wykładników apoptozy plemników i skuteczności zapłodnienia metodą pozaustrojową. Grunewald i wsp. w 2006 i 2009 roku publikowali wyniki świadczące o zaburzeniach reakcji kapacytacji związanych z nasiloną apoptozą plemników, a w 2008 roku Grunewald i wsp. opublikowali wyniki prowadzonych na modelu zwierzęcym badań związku apoptozy plemników ze zdolnością gamety męskiej do penetracji oocytu (Grunewald i wsp., 2006a; Grunewald i wsp., 2008; Grunewald i wsp., 2009a). Okazało się, że zdolność ta jest znacznie obniżona w plemnikach z wysokimi odsetkami błonowej PST i aktywnej formy kaspazy-3.

W prezentowanych w tej pracy wynikach badań, prowadzonych po raz pierwszy na modelu ludzkim, porównano wyniki zapłodnienia pozaustrojowego metodą

konwencjonalnego IVF (grupa A) oraz ICSI (grupa B) i skorelowano skuteczność zapłodnień z obecnością PST i aktywnej formy c3. Choć do obu metod zastosowano próbki nasienia od różnych pacjentów i w przypadku konwencjonalnego IVF średnie parametry nasienia były istotnie lepsze niż w przypadku ICSI, to jednak po porównaniu wykładników apoptozy w obu grupach nie stwierdzono między nimi istotnej statystycznie różnicy. Daje to możliwość obiektywnego zbadania związku wykładników apoptozy ze skutecznością zapłodnienia dla obu stosowanych metod zapłodnienia *in vitro*.

Podczas analizy wyników w grupie A okazało się, że skuteczność konwencjonalnego IVF znacząco spada wraz ze wzrostem odsetka plemników z błonową PST oraz z aktywną formą c3. Równocześnie w grupie B nie stwierdzono podobnej zależności – skuteczność ICSI nie była zależna od nasilenia apoptozy plemników. Wyniki te potwierdzono dzieląc grupę A i B na podgrupy 1 i 2 – z dokonanym i nie dokonanym zapłodnieniem w co najmniej jednym oocyte. Tutaj także zależność skuteczności zapłodnienia zaobserwowano jedynie w grupie leczonej przy pomocy konwencjonalnego IVF, przy braku zależności skuteczności zapłodnienia i wykładników apoptozy w grupie leczonej ICSI. Można na tej podstawie wnioskować, że apoptoza plemników ma związek z którymś z etapów zapłodnienia pomijanych podczas ICSI – rozpoznaniem, fuzją lub penetracją oocytu przez gametę męską. Tym bardziej uzasadniona wydaje się sugestia, by zaangażować ocenę apoptozy plemników do procesu kwalifikacji par do odpowiedniej metody zapłodnienia pozaustrojowego. Badanie wykładników apoptozy może także stać się użytecznym narzędziem do prognozowania wyników leczenia niezamierzonej bezdzietności.

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Publikacje ostatnich lat potwierdzają udział estrogenów w fizjologii i patofizjologii męskiego układu rozrodczego. Postuluje się, że zmiany struktury genów kodujących receptory estrogenowe mogą zaburzać transdukcję sygnału estrogenowego i obniżać wartość biologiczną nasienia. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć nieliczne publikacje wskazujące na związek pomiędzy występowaniem SNP w genach *ESR1* i *ESR2* a wartością biologiczną nasienia. Jednak uzyskane w tej pracy wyniki nie potwierdzają związku polimorfizmów miejsc restrykcyjnych *PvuII* i *XbaI* *ESR1* oraz *AluI*, *RsaI* i *AlwNI* *ESR2* z męską płodnością ani w zakresie parametrów nasienia, ani w zakresie skuteczności zapłodnienia, zarówno metodą konwencjonalnego IVF jak i ICSI. Wydaje się, że uzyskana istotnie statystyczna zależność między wyższą skutecznością konwencjonalnego IVF a genotypem TC *PvuII* powinna być traktowana ostrożnie, gdyż pozostałe wyniki nie potwierdzają tego typu zależności w badanej populacji. Podobnie w przypadku uzyskanej istotnej statystycznie zależności genotypu GA *RsaI* z wyższym odsetkiem apoptozy plemników – z uwagi na bardzo rzadkie występowanie tego genotypu w populacji trudno na podstawie tego wyniku wyciągać jednoznaczne wnioski. Być może jest to jednak oznaka pewnej tendencji i należałoby przeprowadzić analizy na większej grupie pacjentów uzupełnione o sekwencjonowanie tych obszarów badanych genów.

Zachęcające wyniki uzyskano w analizie zależności pomiędzy obecnością w plemnikach wykładników apoptozy a funkcją gamet. Silna ujemna korelacja obu badanych wykładników apoptozy i wszystkich parametrów nasienia zwraca uwagę na niewątpliwy udział apoptozy plemników w patofizjologii gamety męskiej. Ujemna korelacja wykładników apoptozy ze skutecznością konwencjonalnego IVF, ale nie ICSI wskazuje, że jest ona istotnym czynnikiem związanym z procesem rozpoznania, fuzji i/lub penetracji oocyty przez gametę męską i może być ważnym narzędziem

diagnostycznym dla właściwej kwalifikacji pacjentów do metody leczenia oraz przewidywania jego skuteczności.

Realizując krok po kroku założenia pracy opracowano następujące wnioski:

1. W populacji badanej nie zaobserwowano związku polimorfizmów miejsc restrykcyjnych *PvuII* i *XbaI* genu receptora estrogenowego 1 ani *AluI*, *RsaI* i *AlwMI* genu receptora estrogenowego 2 z koncentracją, ruchliwością ruchem postępowym, morfologią, ani żywotnością plemników
2. Nie stwierdzono u badanych pacjentów jednoznacznych zależności żadnego z genotypów badanych miejsc restrykcyjnych genów kodujących receptory estrogenowe 1 i 2 z odsetkiem plemników męskich z wykładnikami apoptozy.
3. Nie udowodniono wyraźnego związku polimorfizmów genów receptorów estrogenowych 1 i 2 ze skutecznością zapłodnienia pozaustrojowego metodą konwencjonalnego IVF ani metodą mikroiniekcyjną.
4. Zauważono ujemną korelację wykładników apoptozy plemników ze skutecznością zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF. Wskazuje to na potencjalną wartość oceny markerów apoptozy gamet dla optymalizacji diagnostyki i poprawy wyników leczenia niepłodności męskiej.

8. STRESZCZENIE

Tytuł: „Ocena związku wybranych polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2 oraz wykładników apoptozy plemników z parametrami określającymi zdolność zapładniającą gamet męskich”

Autor: Joanna Talarczyk-Desole

Słowa kluczowe: niepłodność męska, SNP, polimorfizmy pojedynczych nukleotydów, receptory estrogenowe 1 i 2, ESR 1, ESR 2, apoptoza plemników, zapłodnienie pozaustrojowe, zdolność zapładniająca plemników męskich

Wstęp: Czynniki męski stanowi przyczynę niezamierzonej bezdzietności w około 40-60% przypadków. Podłoże molekularne niepłodności męskiej jest najczęściej nie znane. Rośnie ilość doniesień potwierdzających rolę estrogenów w patogenezie tego schorzenia. Estrogeny są produkowane w jądrach oraz prawdopodobnie w plemnikach męskich, a ich receptory (ESR1 i ESR2) są szeroko rozpowszechnione w męskim układzie rozrodczym. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) w obrębie genów kodujących ESR (*ESR1* i *ESR2*) mogą prowadzić do zmiany struktury receptorów. Postuluje się, że zaburzenia transdukcji sygnału estrogenowego związane z nieprawidłowością struktury ich receptorów, mogą prowadzić do obniżenia wartości biologicznej nasienia, a w konsekwencji: pogorszenia parametrów seminologicznych, podwyższonego odsetka plemników z wykładnikami apoptozy oraz obniżonej zdolności penetracji oocyta przez plemnik. Czynniki te mogą skutkować pogorszeniem wyników leczenia niepłodności

Cele pracy: **1.** Ocena związku wybranych polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2 z parametrami nasienia w standardowej ocenie seminologicznej; **2.** Analiza związku wybranych polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2 z wykładnikami apoptozy gamet męskich; **3.** Zbadanie relacji wybranych polimorfizmów genów receptora estrogenowego 1 i 2 ze skutecznością zapłodnienia

pozaustrojowego metodą klasyczną i mikroiniekcyjną; 4. Analiza związku wykładników apoptozy plemników ze skutecznością zapłodnienia pozaustrojowego metodą klasyczną i mikroiniekcyjną.

Materiał: Pacjenci leczeni przy pomocy zapłodnienia ustrojowego (IVF) w Ośrodku Diagnostyki i Leczenia Niepłodności (ODiLN) przy Klinice Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu w czasie od stycznia 2011 do listopada 2012 (konwencjonalne IVF – 46 par, ICSI – 76 par). Kryteria wykluczenia po stronie partnerki: wiek powyżej 39 lat, FSH w 3-5 dniu cyklu >12 mIU/ml, endometrioza III i IV stopnia według klasyfikacji Amerykańskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu, zespół policystycznych jajników; kryteria wykluczenia po stronie partnera: hipogonadyzm hipogonadotropowy, azoospermia. Kryterium włączenia do badania stanowiło pobranie co najmniej dwóch dojrzałych oocytów w stadium MII. Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu - numery uchwał 425/11, 766/13 oraz 855/13. Do badań SNP *ESR1* i *ESR2* pobrano krew od 116 mężczyzn, ocenę seminologiczną nasienia przeprowadzono u 116 mężczyzn. Ocenę błonowej translokacji fosfatydyloseryny (PST) przeprowadzono u 91 mężczyzn, zaś aktywnej formy kaspazy-3 (c3) u 74 mężczyzn.

Metody: Procedurę IVF prowadzono według standardu stosowanego w ODiLN, pacjentki poddano stymulacji według długiego protokołu stymulacji z agonistą GnRH; ocenę seminologiczną prowadzono według rekomendacji WHO z 2010 roku; ocenę wykładników apoptozy plemników - błonowej translokacji fosfatydyloseryny (PST) i obecności gamet z aktywną formą kaspazy-3 (c3) prowadzono po znakowaniu plemników specyficznymi fluorochromami i analizowano przy pomocy cytometrii przepływowej. W celu przeprowadzenia badań genetycznych izolowano całkowite genomowe DNA z pełnej krwi obwodowej. Następnie powielano DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Produkty PCR porównywano ze wzorcem wielkości przy użyciu elektroforezy. Polimorfizmy badanych genów oznaczano przy pomocy techniki PCR połączonej z analizą restrykcyjną (PCR-RFLP). Losowe próby sekwencjonowano celem potwierdzenia prawidłowości produktów względem sekwencji zdeponowanych w bazie NCBI.

Wyniki: W ocenie związku SNP *ESR1* z koncentracją, ruchliwością, morfologią i żywotnością plemników w zależności od genotypu uzyskano następujące wyniki:

dla *PvuII*: $p > 0,05$ dla wszystkich parametrów nasienia; dla *XbaI*: $p > 0,05$ dla wszystkich parametrów nasienia. Oceniając zależności SNP *ESR2* z koncentracją, ruchliwością, morfologią i żywotnością plemników w zależności od genotypu uzyskano: dla *AluI*: $p > 0,05$ dla wszystkich parametrów, dla *RsaI*: $p > 0,05$ dla wszystkich parametrów i dla *AlwNI*: $p > 0,05$ dla wszystkich parametrów. W ocenie związku SNP *ESR1* z wykładnikami apoptozy plemników stwierdzono: dla *PvuII* $p > 0,05$ dla PST i $p > 0,05$ dla c3; dla *XbaI* $p > 0,05$ dla PST i $p > 0,05$. Badając zależność SNP *ESR2* z wykładnikami apoptozy plemników uzyskano: $p > 0,05$ dla *AluI* i *AlwNI* zarówno w przypadku PST jak i c3, *RsaI*: średni odsetek plemników z błonową PST był wyższy w przypadku genotypu GA niż genotypu GG ($p < 0,05$), średni odsetek plemników z aktywną formą c3 pozostawał bez różnicy istotnej statystycznie między genotypami ($p > 0,05$). W analizie zależności skuteczności zapłodnienia pozaustrojowego i genotypów badanych SNP stwierdzono, że zarówno w przypadku *ESR1* jak i *ESR2* dla żadnego z SNP nie ma istotnej statystycznie zależności genotypów i wyniku zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF ($p > 0,05$ dla *PvuII* i *XbaI* oraz $p > 0,05$ dla *AluI*, *RsaI* i *AlwNI*) ani ICSI ($p > 0,05$ dla *PvuII* i *XbaI* oraz $p > 0,05$ dla *AluI*, *RsaI* i *AlwNI*). W badaniu korelacji odsetka plemników z wykładnikami apoptozy ze skutecznością zapłodnienia pozaustrojowego stwierdzono, że wraz ze wzrostem odsetka plemników z błonową PST jak i z aktywną formą c3 spada skuteczność konwencjonalnego IVF (odpowiednio $r = -0,4$ i $p = 0,04$ dla plemników z PST oraz $r = -0,4$ i $p = 0,02$ dla plemników z aktywną formą c3). Podobnej korelacji nie zaobserwowano w przypadku ICSI (odpowiednio $r = -0,2$ i $p = 0,85$ dla plemników z PST oraz $r = -0,1$ i $p = 0,51$ dla plemników z aktywną formą c3)

Wnioski: 1. W populacji badanej nie zaobserwowano związku polimorfizmów miejsc restrykcyjnych *PvuII* i *XbaI* genu receptora estrogenowego 1. ani *AluI*, *RsaI* i *AlwNI* genu receptora estrogenowego 2. z koncentracją, ruchliwością ruchem postępowym, morfologią ani żywotnością plemników. 2. Nie stwierdzono u badanych pacjentów wyraźnej zależności żadnego z genotypów badanych miejsc restrykcyjnych genów kodujących receptory estrogenowe 1 i 2 z odsetkiem plemników męskich z wykładnikami apoptozy. 3. Nie udowodniono jednoznacznego związku polimorfizmów genów receptorów estrogenowych 1 i 2 ze skutecznością zapłodnienia pozaustrojowego metodą konwencjonalnego IVF ani metodą mikroiniekcijną. 4. Zauważono ujemną korelację wykładników apoptozy plemników ze skutecznością

zapłodnienia metodą konwencjonalnego IVF. Wskazuje to na potencjalną wartość oceny markerów apoptozy gamet dla optymalizacji diagnostyki i poprawy wyników leczenia niepłodności męskiej.

9. SUMMARY

Title: “Correlation between selected polymorphisms of estrogen receptor 1 and 2 genes and sperm apoptosis with parameters defining fertilizing potential of male gametes”

Author: Joanna Talarczyk-Desole

Key words: male infertility, SNP, single nucleotide polymorphisms, estrogen receptors 1 and 2, ESR 1, ESR 2, sperm apoptosis, in vitro fertilization, IVF, fertilizing potential of the sperm

Introduction: Male factor is responsible for infertility in around 40-60 % of the cases. Molecular basis of this disease is most often unknown. In literature can lately be found increasing amount of papers confirming the role of estrogens in pathogenesis of male infertility. Estrogens are produced in testes and probably also in spermatozoa. Their receptors (ESR1 and ESR2) are widely spread in male reproductive tract. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes coding estrogen receptors (*ESR1* and *ESR2*) may lead to structural variations of the receptors. It is postulated, that modulation of estrogen signaling caused by structural aberrations of their receptors may cause decrease of biological value of the sperm, including lowered sperm parameters, increased amount of apoptotic markers in the semen and lower sperm penetration potential of spermatozoa. All these factors can lead to male infertility and decrease the outcome of the treatment.

Aims of the study: **1.** Checking if selected SNPs of *ESR1* and *ESR2* are related to sperm parameters. **2.** Evaluation, if selected SNPs of *ESR1* and *ESR2* are related to sperm apoptosis. **3.** Checking if selected SNPs of *ESR1* and *ESR2* influence outcome of conventional *in vitro* fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **4.** Evaluation of the correlation between sperm apoptosis and the outcome of IVF or ICSI.

Material: Patients treated for infertility with IVF in Center of Diagnostics and Treatment of Infertility by Clinic of Infertility and Reproductive Endocrinology, Poznań University of Medical Sciences from January 2011 to November 2012 (conventional IVF – 46 couples, ICSI – 76 couples). Female exclusion criteria were: age over 39 years, FSH in 3-5 day of the cycle >12 mIU/ml, 3rd or 4th grade of endometriosis according to American Society for Reproductive Medicine, polycystic ovaries syndrome. Male exclusion criteria were: hypogonadotropic hypogonadism and azoospermia. Inclusion criterion was obtaining at least two mature oocytes in MII stadium. The study was accepted by Poznań University of Medical Sciences Bioethic Commission – numbers of decisions: 425/11, 766/13 and 855/13. Blood for SNPs of *ESR1* and *ESR2* were analyzed in 116 male patients, basic seminal analysis was performed in 116 males, PST was evaluated in 91 patients and active form of caspase-3 was evaluated in 74 males.

Methods: IVF procedures were performed according to the standard of the Clinic. Female patients underwent controlled ovarian stimulation according to long protocol with GnRH agonist. Basic seminal parameters were analyzed according to WHO recommendations from 2010. Markers of apoptosis (phosphatidylserine translocation – PST and active form of caspase-3 – c3) were evaluated after matching the spermatozoa with specific fluorochromes and analyzed in flow cytometry. DNA was isolated from patients' blood, amplified in polymerase chain reaction (PCR) and compared with an assay in electrophoresis. PCR-RFLP was used to analyze SNPs. Random specimen were sequenced and compared with standard from NCBI base.

Results: In evaluation of the relation between genotypes of SNPs of *ESR1* and sperm concentration, progressive motility, morphology and viability following results were obtained for *PvuII*: $p > 0,05$ and for *XbaI*: $p > 0,05$ for all sperm parameters. In evaluation of the relation between genotypes of SNPs of *ESR2* and sperm concentration, progressive motility, morphology and viability following results were obtained for *AluI*, *RsaI* and *AlwNI*: $p > 0,05$ for all sperm parameters. Then the relation of markers of apoptosis in sperm and genotypes of SNPs of *ESR1* was analyzed and the results were: for *PvuII*: $p > 0,05$ for PST and $p > 0,05$ for c3, for *XbaI*: $p > 0,05$ for PST and $p > 0,05$ for c3. When the relation of markers of apoptosis in sperm and genotypes of SNPs of *ESR2* was analyzed, the results were as following: $p > 0,05$ for both markers of apoptosis for

AluI and *AlwNI*. For *RsaI*: more PST was found in GA genotype than in GG ($p < 0,05$); for *c3* no significance difference between genotypes was observed ($p > 0,05$). In evaluation of relations between SNPs of *ESR1* and *ESR2* and fertilization outcome no connection between SNPs of either gene and IVF success was observed ($p > 0,05$ for all SNPs and conventional IVF, $p > 0,05$ for all SNPs and ICSI). In evaluation of correlation between markers of apoptosis in sperm and fertilization outcome it turned out that the outcome of conventional IVF is worse when the amount of sperm with PST and *c3* increase ($r = -0,4$ and $p = 0,04$ for PST, $r = -0,4$ and $p = 0,02$ for *c3*, respectively). Similar correlation was not observed in case of ICSI ($r = -0,2$, $p = 0,85$ for PST and $r = -0,1$ and $p = 0,51$ for *c3*).

Conclusions: **1.** In examined population the connection between selected SNPs of *ESR1* and *ESR2* and sperm parameters has not been found. **2.** There was no unambiguous relation of analyzed SNPs of *ESR1* and *ESR2* and markers of apoptosis. **3.** No exact relation between examined SNPs of *ESR1* and *ESR2* and fertilizing potential of the sperm was found. **4.** Markers of apoptosis in the sperm were negatively correlated with the outcome of conventional IVF. Therefore evaluation of markers of apoptosis in the sperm could be valuable method helpful in optimalization of diagnostic and therapeutic outcome of male infertility.

PIŚMIENICTWO

Abbott, AL, Ducibella, T (2001). "Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis." *Front Biosci* 6: D792-806.

Adams, JM, Cory, S (2002). "Apoptosomes: engines for caspase activation." *Curr Opin Cell Biol* 14(6): 715-720.

Adlanmerini, M, Solinhac, R, Abot, A, Fabre, A, Raymond-Letron, I, Guihot, AL, Boudou, F, Sautier, L, Vessieres, E, Kim, SH, Liere, P, Fontaine, C, Krust, A, Chambon, P, Katzenellenbogen, JA, Gourdy, P, Shaul, PW, Henrion, D, Arnal, JF, Lenfant, F (2014). "Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor alpha in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(2): E283-290.

Aitken, J (2013). "Falling sperm counts twenty years on: where are we now?" *Asian Journal of Andrology* 15(2): 204-207.

Aitken, RJ, Baker, MA (2013a). "Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development." *Int J Dev Biol* 57(2-4): 265-272.

Aitken, RJ, Baker, MA (2013b). "Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection." *J Reprod Immunol* 100(1): 11-19.

Aitken, RJ, Nixon, B (2013c). "Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored." *Mol Hum Reprod* 19(12): 785-793.

Aitken, RJ, De Iuliis, GN (2007). "Origins and consequences of DNA damage in male germ cells." *Reprod Biomed Online* 14(6): 727-733.

Aitken, RJ, De Iuliis, GN (2010). "On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa." *Mol Hum Reprod* 16(1): 3-13.

Aitken, RJ, Findlay, JK, Hutt, KJ, Kerr, JB (2011a). "Apoptosis in the germ line." *Reproduction* 141(2): 139-150.

Aitken, RJ, Koppers, AJ (2011b). "Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa." *Asian J Androl* 13(1): 36-42.

Aitken, RJ, Smith, TB, Jobling, MS, Baker, MA, De Iuliis, GN (2014). "Oxidative stress and male reproductive health." *Asian J Androl* 16(1): 31-38.

Alonso-Magdalena, P, Ropero, AB, Garcia-Arevalo, M, Soriano, S, Quesada, I, Muhammed, SJ, Salehi, A, Gustafsson, JA, Nadal, A (2013). "Antidiabetic actions of an estrogen receptor beta selective agonist." *Diabetes* 62(6): 2015-2025.

Anand-Ivell, R, Ivell, R (2011). "The special systems biology of the sperm." *Biochem J* 436(3): e3-5.

Ansonoff, MA, Etgen, AM (1998). "Estradiol elevates protein kinase C catalytic activity in the preoptic area of female rats." *Endocrinology* 139(7): 3050-3056.

Aquila, S, Sisci, D, Gentile, M, Middea, E, Catalano, S, Carpino, A, Rago, V, Ando, S (2004). "Estrogen receptor (ER) alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway." *J Clin Endocrinol Metab* 89(3): 1443-1451.

Arao, Y, Hamilton, KJ, Goulding, EH, Janardhan, KS, Eddy, EM, Korach, KS (2012). "Transactivating function (AF) 2-mediated AF-1 activity of estrogen receptor alpha is crucial to maintain male reproductive tract function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(51): 21140-21145.

Ascenzi, P, Bocedi, A, Marino, M (2006a). "Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health." *Mol Aspects Med* 27(4): 299-402.

Aschim, EL, Giwercman, A, Stahl, O, Eberhard, J, Cwikiel, M, Nordenskjold, A, Haugen, TB, Grotmol, T, Giwercman, YL (2005). "The *RsaI* polymorphism in the estrogen receptor-beta gene is associated with male infertility." *J Clin Endocrinol Metab* 90(9): 5343-5348.

Ashkenazi, A, Dixit, VM (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* 281(5381): 1305-1308.

ASRM (2012). "Endometriosis and infertility: a committee opinion." *Fertil Steril* 98(3): 591-598.

Atanassova, N, Mckinnell, C, Turner, KJ, Walker, M, Fisher, JS, Morley, M, Millar, MR, Groome, NP, Sharpe, RM (2000). "Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels." *Endocrinology* 141(10): 3898-3907.

Auger, J, Kunstmann, JM, Czyglik, F, Jouannet, P (1995). "Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years." *N Engl J Med* 332(5): 281-285.

Avenarius, MR, Hildebrand, MS, Zhang, Y, Meyer, NC, Smith, LL, Kahrizi, K, Najmabadi, H, Smith, RJ (2009). "Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein." *Am J Hum Genet* 84(4): 505-510.

Baker, MA, Nixon, B, Naumovski, N, Aitken, RJ (2012). "Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa." *Syst Biol Reprod Med* 58(4): 211-217.

Barros, RP, Gustafsson, JA (2011). "Estrogen receptors and the metabolic network." *Cell Metab* 14(3): 289-299.

Barroso, G, Morshedi, M, Oehninger, S (2000). "Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa." *Hum Reprod* 15(6): 1338-1344.

Barroso, G, Taylor, S, Morshedi, M, Manzur, F, Gavino, F, Oehninger, S (2006). "Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations." *Fertil Steril* 85(1): 149-154.

Bilinska, B, Schmalz-Fraczek, B, Sadowska, J, Carreau, S (2000). "Localization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors alpha and beta in testicular cells--an immunohistochemical study of the bank vole." *Acta Histochem* 102(2): 167-181.

Bilinska, B, Schmalz-Fraczek, B, Kotula, M, Carreau, S (2001). "Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry." *Mol Cell Endocrinol* 178(1-2): 189-198.

Bilinska, B, Wiszniewska, B, Kosiniak-Kamysz, K, Kotula-Balak, M, Gancarczyk, M, Hejmej, A, Sadowska, J, Marchlewicz, M, Kolasa, A, Wenda-Rozewicka, L (2006). "Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches." *Reprod Biol* 6 Suppl 1: 43-58.

Boivin, J, Bunting, L, Collins, JA, Nygren, KG (2007). "International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care." *Hum Reprod* 22(6): 1506-1512.

Bonduelle, M, Liebaers, I, Deketelaere, V, Derde, MP, Camus, M, Devroey, P, Van Steirteghem, A (2002). "Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999)." *Hum Reprod* 17(3): 671-694.

Botto, M (2004). "Phosphatidylserine receptor and apoptosis: consequences of a non-ingested meal." *Arthritis Res Ther* 6(4): 147-150.

Brill, A, Torchinsky, A, Carp, H, Toder, V (1999). "The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development." *J Assist Reprod Genet* 16(10): 512-519.

Brinkman, BM (2004). "Splice variants as cancer biomarkers." *Clin Biochem* 37(7): 584-594.

Carreau, S, Bouraima-Lelong, H, Delalande, C (2011a). "Estrogens in male germ cells." *Spermatogenesis* 1(2): 90-94.

Carreau, S, Bouraima-Lelong, H, Delalande, C (2011b). "Estrogens: new players in spermatogenesis." *Reprod Biol* 11(3): 174-193.

Carreau, S, Bouraima-Lelong, H, Delalande, C (2012a). "Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis." *Adv Med Sci* 57(1): 31-36.

Carreau, S, Bouraima-Lelong, H, Delalande, C (2012b). "Role of estrogens in spermatogenesis." *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 1-11.

Carreau, S, Bourguiba, S, Lambard, S, Galeraud-Denis, I, Genissel, C, Levallet, J (2002). "Reproductive system: aromatase and estrogens." *Mol Cell Endocrinol* 193(1-2): 137-143.

Carreau S, LS, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. (2003). "Aromatase expression and role of estrogens in male gonad - a review." *Reprod Biol Endocrinol*. 2003 Apr(11): 1-35.

Chakravarti, A (1999). "Population genetics--making sense out of sequence." *Nat Genet* 21(1 Suppl): 56-60.

Chang, FW, Sun, GH, Cheng, YY, Chen, IC, Chien, HH, Wu, GJ (2010). "Effects of varicocele upon the expression of apoptosis-related proteins." *Andrologia* 42(4): 225-230.

Chang, H, Suarez, SS (2011). "Two distinct Ca(2+) signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice." *Biol Reprod* 85(2): 296-305.

Chang, MC, Pincus, G (1951). "Physiology of fertilization in mammals." *Physiol Rev* 31(1): 1-26.

Chevalier, N, Paul-Bellon, R, Camparo, P, Michiels, JF, Chevallier, D, Fenichel, P (2014). "Genetic variants of GPER/GPR30, a novel estrogen-related G protein receptor, are associated with human seminoma." *Int J Mol Sci* 15(1): 1574-1589.

Cho, C (2012). "Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization." *Nat Rev Urol* 9(10): 550-560.

Collins, FS (1997). "Preparing health professionals for the genetic revolution." *JAMA* 278(15): 1285-1286.

Cory, S, Adams, JM (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* 2(9): 647-656.

Czupryńska K., MM, Wiszniewska B. (2007). "Wpływ ksenoestrogenów na męski układ płciowy." *Postępy biologii komórki* 34(2): 317-333.

De Marinis, E, Fiocchetti, M, Acconcia, F, Ascenzi, P, Marino, M (2013). "Neuroglobin upregulation induced by 17beta-estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H2O2-induced apoptosis of neuroblastoma cells." *Cell Death Dis* 4: e508.

Depa-Martynow, M, Jędrzejczak, P, Pawelczyk, L (2007). "Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program." *Folia Histochem Cytobiol* 45 Suppl 1: S85-89.

Dey, P, Barros, RP, Warner, M, Strom, A, Gustafsson, JA (2013). "Insight into the mechanisms of action of estrogen receptor beta in the breast, prostate, colon, and CNS." *J Mol Endocrinol* 51(3): T61-74.

Dirican, EK, Ozgun, OD, Akarsu, S, Akin, KO, Ercan, O, Ugurlu, M, Camsari, C, Kanyilmaz, O, Kaya, A, Unsal, A (2008). "Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction." *J Assist Reprod Genet* 25(8): 375-381.

Donnelly, ET, Lewis, SE, McNally, JA, Thompson, W (1998). "In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome." *Fertil Steril* 70(2): 305-314.

Ebling, FJ, Brooks, AN, Cronin, AS, Ford, H, Kerr, JB (2000). "Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse." *Endocrinology* 141(8): 2861-2869.

Eddy, EM, Washburn, TF, Bunch, DO, Goulding, EH, Gladen, BC, Lubahn, DB, Korach, KS (1996). "Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility." *Endocrinology* 137(11): 4796-4805.

Eisenbach, M (2003). "Why are sperm cells phagocytosed by leukocytes in the female genital tract?" *Med Hypotheses* 60(4): 590-592.

Eley, A, Hosseinzadeh, S, Hakimi, H, Geary, I, Pacey, AA (2005). "Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide." *Hum Reprod* 20(9): 2601-2607.

Elmore, S (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.

Enmark, E, Pelto-Huikko, M, Grandien, K, Lagercrantz, S, Lagercrantz, J, Fried, G, Nordenskjold, M, Gustafsson, JA (1997). "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." *J Clin Endocrinol Metab* 82(12): 4258-4265.

Farhat, MY, Lavigne, MC, Ramwell, PW (1996). "The vascular protective effects of estrogen." *FASEB J* 10(5): 615-624.

Feng, Y, Manka, D, Wagner, KU, Khan, SA (2007). "Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(37): 14718-14723.

Filipiak, E, Suliborska, D, Laszczynska, M, Walczak-Jedrzejowska, R, Oszukowska, E, Marchlewska, K, Kula, K, Slowikowska-Hilczer, J (2012). "Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis." *Folia Histochem Cytobiol* 50(3): 340-345.

Flesch, FM, Gadella, BM (2000). "Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization." *Biochim Biophys Acta* 1469(3): 197-235.

Flesch, FM, Wijnand, E, Van De Lest, CH, Colenbrander, B, Van Golde, LM, Gadella, BM (2001). "Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida." *Mol Reprod Dev* 60(1): 107-115.

Fujimoto, N, Jinno, N, Kitamura, S (2004a). "Activation of estrogen response element dependent transcription by thyroid hormone with increase in estrogen receptor levels in a rat pituitary cell line, GH3." *J Endocrinol* 181(1): 77-83.

Fujimoto, N, Kitamura, S (2004b). "Effects of environmental estrogenic chemicals on AP1 mediated transcription with estrogen receptors alpha and beta." *J Steroid Biochem Mol Biol* 88(1): 53-59.

Gadella, BM (2012). "Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation." *Reprod Fertil Dev* 25(1): 26-37.

Gallegos, G, Ramos, B, Santiso, R, Goyanes, V, Gosalvez, J, Fernandez, JL (2008). "Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma*." *Fertil Steril* 90(2): 328-334.

Ganguly, A, Bansal, P, Gupta, T, Gupta, SK (2010). "'ZP domain' of human zona pellucida glycoprotein-1 binds to human spermatozoa and induces acrosomal exocytosis." *Reprod Biol Endocrinol* 8: 110.

- Gardner, AJ, Evans, JP (2006). "Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm." *Reprod Fertil Dev* 18(1-2): 53-61.
- Gorczyca, W, Traganos, F, Jesionowska, H, Darzynkiewicz, Z (1993). "Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells." *Exp Cell Res* 207(1): 202-205.
- Govindaraju, A, Dogan, S, Rodriguez-Osorio, N, Grant, K, Kaya, A, Memili, E (2012). "Delivering value from sperm proteomics for fertility." *Cell Tissue Res* 349(3): 783-793.
- Grunewald, S, Baumann, T, Paasch, U, Glander, HJ (2006a). "Capacitation and acrosome reaction in nonapoptotic human spermatozoa." *Ann N Y Acad Sci* 1090: 138-146.
- Grunewald, S, Paasch, U, Said, TM, Rasch, M, Agarwal, A, Glander, HJ (2006b). "Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa." *Cell Tissue Bank* 7(2): 99-104.
- Grunewald, S, Kriegel, C, Baumann, T, Glander, HJ, Paasch, U (2009a). "Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa." *Hum Reprod* 24(9): 2071-2078.
- Grunewald, S, Reinhardt, M, Blumenauer, V, Said, TM, Agarwal, A, Abu Hmeidan, F, Glander, HJ, Paasch, U (2009b). "Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility." *Fertil Steril* 92(2): 572-577.
- Grunewald, S, Sharma, R, Paasch, U, Glander, HJ, Agarwal, A (2009c). "Impact of caspase activation in human spermatozoa." *Microsc Res Tech* 72(11): 878-888.
- Grunewald, S, Said, TM, Paasch, U, Glander, HJ, Agarwal, A (2008). "Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity." *Int J Androl* 31(3): 325-330.
- Gustafsson, JA (2003). "What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling." *Trends Pharmacol Sci* 24(9): 479-485.

He, S, Wang, L, Miao, L, Wang, T, Du, F, Zhao, L, Wang, X (2009). "Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha." *Cell* 137(6): 1100-1111.

Heldring, N, Pike, A, Andersson, S, Matthews, J, Cheng, G, Hartman, J, Tujague, M, Strom, A, Treuter, E, Warner, M, Gustafsson, JA (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." *Physiol Rev* 87(3): 905-931.

Hess, RA (2003). "Estrogen in the adult male reproductive tract: a review." *Reprod Biol Endocrinol* 1: 52.

Hess, RA, Bunick, D, Lee, KH, Bahr, J, Taylor, JA, Korach, KS, Lubahn, DB (1997). "A role for oestrogens in the male reproductive system." *Nature* 390(6659): 509-512.

Hevir, N, Trost, N, Debeljak, N, Rizner, TL (2011). "Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines." *Chem Biol Interact* 191(1-3): 206-216.

Hochreiter-Hufford, A, Ravichandran, KS (2013). "Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(1): a008748.

Hymowitz, SG, Dixit, VM (2010). "Unleashing cell death: the Fas-FADD complex." *Nat Struct Mol Biol* 17(11): 1289-1290.

Ickowicz, D, Finkelstein, M, Breitbart, H (2012). "Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases." *Asian J Androl* 14(6): 816-821.

Igney, FH, Krammer, PH (2002). "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack." *J Leukoc Biol* 71(6): 907-920.

Itach, SB, Finklestein, M, Etkovitz, N, Breitbart, H (2012). "Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization." *Dev Biol* 362(2): 154-161.

Ivanova, T, Beyer, C (2000). "Ontogenetic expression and sex differences of aromatase and estrogen receptor-alpha/beta mRNA in the mouse hippocampus." *Cell Tissue Res* 300(2): 231-237.

Jala, VR, Radde, BN, Haribabu, B, Klinge, CM (2012). "Enhanced expression of G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in lung cancer." *BMC Cancer* 12: 624.

Jansen, RP (2003). "The effect of female age on the likelihood of a live birth from one in-vitro fertilisation treatment." *Med J Aust* 178(6): 258-261.

Janusz, P, Kotwicki, T, Andrusiewicz, M, Kotwicka, M (2013). "XbaI and PvuII polymorphisms of estrogen receptor 1 gene in females with idiopathic scoliosis: no association with occurrence or clinical form." *PLoS One* 8(10): e76806.

Jarząbek, K, Koda, M, Walentowicz-Sadlecka, M, Grabiec, M, Laudanski, P, Wołczyński S. "Altered expression of ERs, aromatase, and COX2 connected to estrogen action in type 1 endometrial cancer biology." *Tumour Biol.* 2013 34(6):4007-16

Jędrzejczak, P, Pawelczyk, L, Taszarek-Hauke, G, Kotwicka, M, Warchol, W, Kurpisz, M (2005). "Predictive value of selected sperm parameters for classical in vitro fertilization procedure of oocyte fertilization." *Andrologia* 37(2-3): 72-82.

Jędrzejczak, P, Talarczyk, J, Taszarek-Hauke, G, Berger, A, Hauke, J, Pawelczyk, L (2012). "Zewnętrzna ocena jakości badania nasienia w Polsce." *Ginekol Pol* 83(11): 835-840.

Jędrzejczak, P, Taszarek-Hauke, G, Hauke, J, Pawelczyk, L, Duleba, AJ (2008). "Prediction of spontaneous conception based on semen parameters." *Int J Androl* 31(5): 499-507.

Jensen, EV (1962). "On the mechanism of estrogen action." *Perspect Biol Med* 6: 47-59.

Jensen, EV, Jacobson, HI, Walf, AA, Frye, CA (2010). "Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches." *Physiol Behav* 99(2): 151-162.

Jensen, TK, Carlsen, E, Jorgensen, N, Berthelsen, JG, Keiding, N, Christensen, K, Petersen, JH, Knudsen, LB, Skakkebaek, NE (2002). "Poor semen quality may contribute to recent decline in fertility rates." *Hum Reprod* 17(6): 1437-1440.

Jeyendran, RS, Van Der Ven, HH, Perez-Pelaez, M, Crabo, BG, Zaneveld, LJ (1984). "Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics." *J Reprod Fertil* 70(1): 219-228.

Jones, R (1998). "Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis." *J Reprod Fertil Suppl* 53: 73-84.

Jones, R, James, PS, Oxley, D, Coadwell, J, Suzuki-Toyota, F, Howes, EA (2008). "The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins." *Biol Reprod* 79(3): 421-431.

Kahlert, S, Nuedling, S, Van Eickels, M, Vetter, H, Meyer, R, Grohe, C (2000). "Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway." *J Biol Chem* 275(24): 18447-18453.

Kawano, N, Yoshida, K, Miyado, K, Yoshida, M (2011). "Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis." *J Lipids* 2011: 264706.

Keber, R, Rozman, D, Horvat, S (2013). "Sterols in spermatogenesis and sperm maturation." *J Lipid Res* 54(1): 20-33.

Keene, KL, Mychaleckyj, JC, Smith, SG, Leak, TS, Perlegas, PS, Langefeld, CD, Herrington, DM, Freedman, BI, Rich, SS, Bowden, DW, Sale, MM (2008). "Comprehensive evaluation of the estrogen receptor α gene reveals further evidence for association with type 2 diabetes enriched for nephropathy in an African American population." *Human Genetics* 123(4): 333-341.

Kelly, MJ, Wagner, EJ (1999). "Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors." *Trends Endocrinol Metab* 10(9): 369-374.

Kerr, JF, Wyllie, AH, Currie, AR (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-257.

Khan, SA, Rogers, MA, Khurana, KK, Meguid, MM, Numann, PJ (1998). "Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk." *J Natl Cancer Inst* 90(1): 37-42.

Khatti, A, Pandey, RK, Gupta, NJ, Chakravarty, B, Deenadayal, M, Singh, L, Thangaraj, K (2009a). "Estrogen receptor beta gene mutations in Indian infertile men." *Molecular Human Reproduction* 15(8): 513-520.

- Khatti, A, Pandey, RK, Gupta, NJ, Chakravarty, B, Deendayal, M, Singh, L, Thangaraj, K (2009b). "CA repeat and RsaI polymorphisms in ER β gene are not associated with infertility in Indian men." *International Journal of Andrology* 32(1): 81-87.
- Kim, HP, Lee, JY, Jeong, JK, Bae, SW, Lee, HK, Jo, I (1999). "Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae." *Biochem Biophys Res Commun* 263(1): 257-262.
- Kim, JG, Lim, KS, Kim, EK, Choi, YM, Lee, JY (2001). "Association of vitamin D receptor and estrogen receptor gene polymorphisms with bone mass in postmenopausal Korean women." *Menopause* 8(3): 222-228.
- Kischkel, FC, Hellbardt, S, Behrmann, I, Germer, M, Pawlita, M, Krammer, PH, Peter, ME (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *EMBO J* 14(22): 5579-5588.
- Klinge, CM (2001). "Estrogen receptor interaction with estrogen response elements." *Nucleic Acids Res* 29(14): 2905-2919.
- Kotwicka, M, Filipiak, K, Jędrzejczak, P, Warchol, JB (2008). "Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship?" *Reprod Biomed Online* 16(5): 657-663.
- Kotwicka, M, Jendraszak, M, Jędrzejczak, P (2011a). "Phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: topography in membrane domains and relation to cell vitality." *J Membr Biol* 240(3): 165-170.
- Kotwicka, M, Jendraszak, M, Skibinska, I, Jędrzejczak, P, Pawelczyk, L (2011b). "Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique." *Human Cell* 26(1): 28-34.
- Krege, JH, Hodgin, JB, Couse, JF, Enmark, E, Warner, M, Mahler, JF, Sar, M, Korach, KS, Gustafsson, JA, Smithies, O (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15677-15682.
- Kuiper, GG, Carlsson, B, Grandien, K, Enmark, E, Haggblad, J, Nilsson, S, Gustafsson, JA (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* 138(3): 863-870.

Kumar, R, Thompson, EB (1999). "The structure of the nuclear hormone receptors." *Steroids* 64(5): 310-319.

La Vignera, S, Condorelli, R, Vicari, E, D'agata, R, Calogero, AE (2012). "Effects of varicocelectomy on sperm DNA fragmentation, mitochondrial function, chromatin condensation, and apoptosis." *J Androl* 33(3): 389-396.

Lambard, S, Carreau, S (2005). "Aromatase and oestrogens in human male germ cells." *Int J Androl* 28(5): 254-259.

Lamon-Fava, S, Asztalos, BF, Howard, TD, Reboussin, DM, Horvath, KV, Schaefer, EJ, Herrington, DM (2010). "Association of polymorphisms in genes involved in lipoprotein metabolism with plasma concentrations of remnant lipoproteins and HDL subpopulations before and after hormone therapy in postmenopausal women." *Clin Endocrinol (Oxf)* 72(2): 169-175.

Lau, EM, Young, RP, Lam, V, Li, M, Woo, J (2001). "Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density in postmenopausal Chinese women." *Bone* 29(1): 96-98.

Lazaros, L, Markoula, S, Xita, N, Giannopoulos, S, Gogou, P, Lagos, G, Kyritsis, AP, Georgiou, I (2008). "Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with stroke risk in patients with metabolic syndrome." *Acta Neurol Scand* 117(3): 186-190.

Lazaros, LA, Xita, NV, Kaponis, AI, Zikopoulos, KA, Plachouras, NI, Georgiou, IA (2010). "Estrogen receptor alpha and beta polymorphisms are associated with semen quality." *J Androl* 31(3): 291-298.

Lenzi, A, Gandini, L (2002). "Characterization of human sperm." *Hum Reprod* 17(3): 842; author reply 843.

Lenzi, A, Picardo, M, Gandini, L, Dondero, F (1996). "Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy." *Hum Reprod Update* 2(3): 246-256.

Levin, ER (2009). "Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions." *J Physiol* 587(Pt 21): 5019-5023.

Li, J, Yin, Q, Wu, H (2013). "Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily." *Adv Immunol* 119: 135-153.

Liu, DY, Clarke, GN, Baker, HW (2006). "Tyrosine phosphorylation on capacitated human sperm tail detected by immunofluorescence correlates strongly with sperm-zona pellucida (ZP) binding but not with the ZP-induced acrosome reaction." *Hum Reprod* 21(4): 1002-1008.

Louros, NN, Iconomidou, VA, Giannelou, P, Hamodrakas, SJ (2013). "Structural analysis of peptide-analogues of human Zona Pellucida ZP1 protein with amyloidogenic properties: insights into mammalian Zona Pellucida formation." *PLoS One* 8(9): e73258.

Lubahn, DB, Moyer, JS, Golding, TS, Couse, JF, Korach, KS, Smithies, O (1993). "Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 11162-11166.

Luconi, M, Francavilla, F, Porazzi, I, Macerola, B, Forti, G, Baldi, E (2004). "Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens." *Steroids* 69(8-9): 553-559.

Mansur Ade, P, Nogueira, CC, Strunz, CM, Aldrighi, JM, Ramires, JA (2005). "Genetic polymorphisms of estrogen receptors in patients with premature coronary artery disease." *Arch Med Res* 36(5): 511-517.

Marchetti, C, Gallego, MA, Defossez, A, Formstecher, P, Marchetti, P (2004). "Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters." *Hum Reprod* 19(5): 1127-1134.

Marino, M, Acconcia, F, Bresciani, F, Weisz, A, Trentalance, A (2002). "Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells." *Mol Biol Cell* 13(10): 3720-3729.

Marino, M, Galluzzo, P, Ascenzi, P (2006). "Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription." *Curr Genomics* 7(8): 497-508.

Marino, M, Pallottini, V, Trentalance, A (1998). "Estrogens cause rapid activation of IP3-PKC-alpha signal transduction pathway in HEPG2 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 245(1): 254-258.

Marmar, JL (2001). "The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information." *Hum Reprod Update* 7(5): 461-472.

- Matthijs, A, Harkema, W, Engel, B, Woelders, H (2000). "In vitro phagocytosis of boar spermatozoa by neutrophils from peripheral blood of sows." *J Reprod Fertil* 120(2): 265-273.
- Mclaren, JF (2012). "Infertility evaluation." *Obstet Gynecol Clin North Am* 39(4): 453-463.
- Melville, KM, Kelly, NH, Khan, SA, Schimenti, JC, Ross, FP, Main, RP, Van Der Meulen, MC (2013). "Female mice lacking estrogen receptor-alpha in osteoblasts have compromised bone mass and strength." *J Bone Miner Res*.
- Merzenich, H, Zeeb, H, Blettner, M (2010). "Decreasing sperm quality: a global problem?" *BMC Public Health* 10(1): 24.
- Mikulska, D, Kurzawa, R, Rozewicka, L (1994). "Morphology of in vitro sperm phagocytosis by rat peritoneal macrophages under influence of oily contrast medium (Lipiodol)." *Acta Eur Fertil* 25(3): 203-206.
- Milewski, R, Milewska, AJ, Czerniecki, J, Leśniewska, M, Wołczyński, S (2013). "Analiza profilu demograficznego pacjentów leczonych z powodu niepłodności metodami rozrodu wspomaganego w latach 2005-2010." *Ginekol Pol.* 2013 Jul;84(7):609-14.
- Mishra, DP (2004). "Estrogen-induced Spermatogenic Cell Apoptosis Occurs via the Mitochondrial Pathway: ROLE OF SUPEROXIDE AND NITRIC OXIDE." *Journal of Biological Chemistry* 280(7): 6181-6196.
- Mo, Z, Liu, M, Yang, F, Luo, H, Li, Z, Tu, G, Yang, G (2013). "GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer." *Breast Cancer Res* 15(6): R114.
- Mol, BW, Van Wely, M, Steyerberg, EW (2000). "Using prognostic models in clinical infertility." *Hum Fertil (Camb)* 3(3): 199-202.
- Morley, P, Whitfield, JF, Vanderhyden, BC, Tsang, BK, Schwartz, JL (1992). "A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium." *Endocrinology* 131(3): 1305-1312.
- Nelson, LR, Bulun, SE (2001). "Estrogen production and action." *J Am Acad Dermatol* 45(3 Suppl): S116-124.

Niedziela, M, Talarczyk, J, Jędrzejczak, P (2012). "Testicular adrenal rest tumors (TARTs) as a male infertility factor. Case report." *Ginekol Pol* 83(9): 700-702.

Nilsson, S, Gustafsson, JA (2011). "Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes." *Clin Pharmacol Ther* 89(1): 44-55.

Nitta, H, Bunick, D, Hess, RA, Janulis, L, Newton, SC, Millette, CF, Osawa, Y, Shizuta, Y, Toda, K, Bahr, JM (1993). "Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase." *Endocrinology* 132(3): 1396-1401.

Norbury, CJ, Hickson, ID (2001). "Cellular responses to DNA damage." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 367-401.

Norbury, CJ, Zhivotovsky, B (2004). "DNA damage-induced apoptosis." *Oncogene* 23(16): 2797-2808.

Nott, SL, Huang, Y, Fluharty, BR, Sokolov, AM, Huang, M, Cox, C, Muyan, M (2008). "Do Estrogen Receptor beta Polymorphisms Play A Role in the Pharmacogenetics of Estrogen Signaling?" *Curr Pharmacogenomics Person Med* 6(4): 239-259.

O'Donnell, L, Robertson, KM, Jones, ME, Simpson, ER (2001). "Estrogen and spermatogenesis." *Endocr Rev* 22(3): 289-318.

O'Lone, R, Frith, MC, Karlsson, EK, Hansen, U (2004). "Genomic targets of nuclear estrogen receptors." *Mol Endocrinol* 18(8): 1859-1875.

O'Lone, R, Knorr, K, Jaffe, IZ, Schaffer, ME, Martini, PG, Karas, RH, Bienkowska, J, Mendelsohn, ME, Hansen, U (2007). "Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species." *Mol Endocrinol* 21(6): 1281-1296.

Oehninger, S, Morshedi, M, Weng, SL, Taylor, S, Duran, H, Beebe, S (2003). "Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa." *Reprod Biomed Online* 7(4): 469-476.

Ogata, T, Fukami, M, Yoshida, R, Nagata, E, Fujisawa, Y, Yoshida, A, Yoshimura, Y (2012). "Haplotype analysis of ESR2 in Japanese patients with spermatogenic failure." *J Hum Genet* 57(7): 449-452.

Okabe, M (2013). "The cell biology of mammalian fertilization." *Development* 140(22): 4471-4479.

Olferiev, M, Masuda, E, Tanaka, S, Blank, MC, Pricop, L (2007). "The role of activating protein 1 in the transcriptional regulation of the human FCGR2B promoter mediated by the 343G>C polymorphism associated with systemic lupus erythematosus." *J Biol Chem* 282(3): 1738-1746.

Oosterhuis, GJ, Mulder, AB, Kalsbeek-Batenburg, E, Lambalk, CB, Schoemaker, J, Vermes, I (2000). "Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality?" *Fertil Steril* 74(2): 245-250.

Oren-Benaroya, R, Kipnis, J, Eisenbach, M (2007). "Phagocytosis of human post-capacitated spermatozoa by macrophages." *Hum Reprod* 22(11): 2947-2955.

Paasch, U, Agarwal, A, Gupta, AK, Sharma, RK, Grunewald, S, Thomas, AJ, Jr., Glander, HJ (2003). "Apoptosis signal transduction and the maturity status of human spermatozoa." *Ann N Y Acad Sci* 1010: 486-488.

Paige, LA, Christensen, DJ, Gron, H, Norris, JD, Gottlin, EB, Padilla, KM, Chang, CY, Ballas, LM, Hamilton, PT, McDonnell, DP, Fowlkes, DM (1999). "Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 3999-4004.

Pentikainen, V, Erkkila, K, Suomalainen, L, Parvinen, M, Dunkel, L (2000). "Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* 85(5): 2057-2067.

Petrie, WK, Dennis, MK, Hu, C, Dai, D, Arterburn, JB, Smith, HO, Hathaway, HJ, Prossnitz, ER (2013). "G protein-coupled estrogen receptor-selective ligands modulate endometrial tumor growth." *Obstet Gynecol Int* 2013: 472720.

Rago, V, Siciliano, L, Aquila, S, Carpino, A (2006). Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006; 17: 4-36.

Revankar, CM, Cimino, DF, Sklar, LA, Arterburn, JB, Prossnitz, ER (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." *Science* 307(5715): 1625-1630.

Ricci, G, Perticarari, S, Fragonas, E, Giolo, E, Canova, S, Pozzobon, C, Guaschino, S, Presani, G (2002). "Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes." *Hum Reprod* 17(10): 2665-2672.

Rodriguez, I, Ody, C, Araki, K, Garcia, I, Vassalli, P (1997). "An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis." *EMBO J* 16(9): 2262-2270.

Rodriguez, S, Gaunt, TR, Day, IN (2009). "Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies." *Am J Epidemiol* 169(4): 505-514.

Ryan, J, Ancelin, ML (2012). "Polymorphisms of estrogen receptors and risk of depression: therapeutic implications." *Drugs* 72(13): 1725-1738.

Safarinejad, MR, Shafiei, N, Safarinejad, S (2010). "Association of polymorphisms in the estrogen receptors alpha, and beta (ESR1, ESR2) with the occurrence of male infertility and semen parameters." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 122(4): 193-203.

Sakkas, D, Leppens-Luisier, G, Lucas, H, Chardonens, D, Campana, A, Franken, DR, Urner, F (2003). "Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding." *Biol Reprod* 68(4): 1463-1469.

Sakkas, D, Mariethoz, E, Manicardi, G, Bizzaro, D, Bianchi, PG, Bianchi, U (1999). "Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa." *Rev Reprod* 4(1): 31-37.

Sariibrahim, B, Cogendez, E, Kayatas, S, Asoglu, MR, Koleli, I, Bakir, L (2013). "Does Kruger's strict criteria have prognostic value in predicting ICSI clinical results?" *Clin Exp Obstet Gynecol* 40(2): 257-260.

Saunders, PT (2005). "Does estrogen receptor beta play a significant role in human reproduction?" *Trends Endocrinol Metab* 16(5): 222-227.

Scharfman, HE, Maclusky, NJ (2006). "Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS." *Front Neuroendocrinol* 27(4): 415-435.

Shaaban, AM, Sloane, JP, West, CR, Foster, CS (2002). "Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression." *Am J Pathol* 160(2): 597-604.

- Shadan, S, James, PS, Howes, EA, Jones, R (2004). "Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa." *Biol Reprod* 71(1): 253-265.
- Shupnik, MA, Pitt, LK, Soh, AY, Anderson, A, Lopes, MB, Laws, ER, Jr. (1998). "Selective expression of estrogen receptor alpha and beta isoforms in human pituitary tumors." *J Clin Endocrinol Metab* 83(11): 3965-3972.
- Signorelli, J, Diaz, ES, Morales, P (2012). "Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation." *Cell Tissue Res* 349(3): 765-782.
- Sikora, J, Kempisty, B, Jędrzejczak, P, Jagodzinski, PP (2006). "Influence of DNA damage on fertilizing capacity of spermatozoa." *Przegl Lek* 63(9): 800-802.
- Simoncini, T, Mannella, P, Fornari, L, Caruso, A, Varone, G, Genazzani, AR (2004). "Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells." *Steroids* 69(8-9): 537-542.
- Sinkevicius, KW, Laine, M, Lotan, TL, Woloszyn, K, Richburg, JH, Greene, GL (2009). "Estrogen-dependent and -independent estrogen receptor-alpha signaling separately regulate male fertility." *Endocrinology* 150(6): 2898-2905.
- Solakidi, S, Psarra, AM, Nikolaropoulos, S, Sekeris, CE (2005). "Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece." *Hum Reprod* 20(12): 3481-3487.
- Sousa, AP, Amaral, A, Baptista, M, Tavares, R, Caballero Campo, P, Caballero Peregrin, P, Freitas, A, Paiva, A, Almeida-Santos, T, Ramalho-Santos, J (2011). "Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential." *PLoS One* 6(3): e18112.
- Spence, RD, Wisdom, AJ, Cao, Y, Hill, HM, Mongerson, CR, Stapornkul, B, Itoh, N, Sofroniew, MV, Voskuhl, RR (2013). "Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ERalpha signaling on astrocytes but not through ERbeta signaling on astrocytes or neurons." *J Neurosci* 33(26): 10924-10933.
- Stanger, JD, Vo, L, Yovich, JL, Almahbobi, G (2010). "Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation." *Reproductive BioMedicine Online* 21(4): 474-484.

Styrkarsdottir, U, Halldorsson, BV, Gretarsdottir, S, Gudbjartsson, DF, Walters, GB, Ingvarsson, T, Jonsdottir, T, Saemundsdottir, J, Center, JR, Nguyen, TV, Bagger, Y, Gulcher, JR, Eisman, JA, Christiansen, C, Sigurdsson, G, Kong, A, Thorsteinsdottir, U, Stefansson, K (2008). "Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures." *N Engl J Med* 358(22): 2355-2365.

Suchartwatnachai, C, Wongkularb, A, Srisombut, C, Choktanasiri, W, Chinsomboon, S, Rojanasakul, A (2000). "Cost-effectiveness of IVF in women 38 years and older." *Int J Gynaecol Obstet* 69(2): 143-148.

Sundarrajan, C, Liao, WX, Roy, AC, Ng, SC (2001). "Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders." *J Clin Endocrinol Metab* 86(1): 135-139.

Swann, K, Yu, Y (2008). "The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs." *Int J Dev Biol* 52(5-6): 585-594.

Szczygieł M, KM (2002). Plemniki. Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków. M. Kurpisz. Poznań, Termedia: 191-204.

Szego, CM, Davis, JS (1967). "Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen." *Proc Natl Acad Sci U S A* 58(4): 1711-1718.

Taguchi, A, Kobayashi, J, Suei, Y, Ohtsuka, M, Nakamoto, T, Tanimoto, K, Sanada, M, Tsuda, M, Ohama, K (2003). "Association of estrogen and vitamin D receptor gene polymorphisms with tooth loss and oral bone loss in Japanese postmenopausal women." *Menopause* 10(3): 250-257.

Tanphaichitr, N, Carmona, E, Bou Khalil, M, Xu, H, Berger, T, Gerton, GL (2007). "New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts." *Front Biosci* 12: 1748-1766.

Tesarik, J, Mendoza-Tesarik, R, Mendoza, C (2006). "Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment." *Reprod Biomed Online* 12(6): 715-721.

Thomas, P, Pang, Y, Filardo, EJ, Dong, J (2005). "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells." *Endocrinology* 146(2): 624-632.

Toran-Allerand, CD, Guan, X, Maclusky, NJ, Horvath, TL, Diano, S, Singh, M, Connolly, ES, Jr., Nethrapalli, IS, Tinnikov, AA (2002). "ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury." *J Neurosci* 22(19): 8391-8401.

Tres, LL, Rosselot, C, Kierszenbaum, AL (2004). "Caspase activity inhibition delays programmed spermatogenic cell death in vitro." *Arch Histol Cytol* 67(4): 315-324.

Tsukamoto, K, Inoue, S, Hosoi, T, Orimo, H, Emi, M (1998). "Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus." *J Hum Genet* 43(1): 73-74.

Vawda, AI, Gunby, J, Younglai, EV (1996). "Semen parameters as predictors of in-vitro fertilization: the importance of strict criteria sperm morphology." *Hum Reprod* 11(7): 1445-1450.

Visconti, PE (2009). "Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(3): 667-668.

Wang, C, Lv, X, Jiang, C, Davis, JS (2012). "The putative G-protein coupled estrogen receptor agonist G-1 suppresses proliferation of ovarian and breast cancer cells in a GPER-independent manner." *Am J Transl Res* 4(4): 390-402.

Wang, DG, Fan, JB, Siao, CJ, Berno, A, Young, P, Sapolsky, R, Ghandour, G, Perkins, N, Winchester, E, Spencer, J, Kruglyak, L, Stein, L, Hsie, L, Topaloglou, T, Hubbell, E, Robinson, E, Mittmann, M, Morris, MS, Shen, N, Kilburn, D, Rioux, J, Nusbaum, C, Rozen, S, Hudson, TJ, Lipshutz, R, Chee, M, Lander, ES (1998). "Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome." *Science* 280(5366): 1077-1082.

Wang, L, Du, F, Wang, X (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." *Cell* 133(4): 693-703.

Warenik-Szymankiewicz A, MB (2003). *Estrogeny. Zaburzenia hormonalne*. M. Pawlikowski. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL: 189-190.

Wassarman, PM (2008). "Zona pellucida glycoproteins." *J Biol Chem* 283(36): 24285-24289.

Wassarman, PM, Litscher, ES (2008). "Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida." *Int J Dev Biol* 52(5-6): 665-676.

Weihua, Z, Andersson, S, Cheng, G, Simpson, ER, Warner, M, Gustafsson, JA (2003). "Update on estrogen signaling." *FEBS Lett* 546(1): 17-24.

Weng, SL, Taylor, SL, Morshedi, M, Schuffner, A, Duran, EH, Beebe, S, Oehninger, S (2002). "Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm." *Mol Hum Reprod* 8(11): 984-991.

WHO (1999). *World Health Organization laboratory manual for the examination of human semen and semen–cervical mucus interaction*. Wydanie czwarte. Cambridge University Press, Cambridge, Wielka Brytania.

WHO (2010). *World Health Organization reference values for human semen characteristics*, Cambridge University Press, Cambridge, Wielka Brytania.

Witty, CF, Gardella, LP, Perez, MC, Daniel, JM (2013). "Short-term estradiol administration in aging ovariectomized rats provides lasting benefits for memory and the hippocampus: a role for insulin-like growth factor-I." *Endocrinology* 154(2): 842-852.

Wu, Y, Tibrewal, N, Birge, RB (2006). "Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill." *Trends Cell Biol* 16(4): 189-197.

Xie, BG, Huang, YH, Zhu, WJ, Jin, S (2013). "Comparison of the outcome of conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in moderate male infertility from ejaculate." *Urol Int*.

Yan, Z, Tan, W, Xu, B, Dan, Y, Zhao, W, Deng, C, Chen, W, Tan, S, Mao, Q, Wang, Y, Deng, G (2011). "A cis-acting regulatory variation of the estrogen receptor alpha (ESR1) gene is associated with hepatitis B virus-related liver cirrhosis." *Hum Mutat* 32(10): 1128-1136.

Yu, KD, Rao, NY, Chen, AX, Fan, L, Yang, C, Shao, ZM (2011). "A systematic review of the relationship between polymorphic sites in the estrogen receptor-beta (ESR2) gene and breast cancer risk." *Breast Cancer Res Treat* 126(1): 37-45.

Zhang, QF, Feng, HL, Zhao, L, Liu, P, Li, L, Yan, J, Qiao, J (2011). "Alteration of ERbeta gene RsaI polymorphism may contribute to reduced fertilization rate and embryonic developmental competence." *Asian J Androl* 13(2): 317-321.

Zorn, B, Golob, B, Ihan, A, Kopitar, A, Kolbezen, M (2012). "Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential." J Assist Reprod Genet. 2012 29(4):357-64.